

**Charakterisierung von neuen monoklonalen Kaninchen-  
Antikörpern für die VIP-/PACAP-Rezeptoren VPAC-1 und  
VPAC-2**

**Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades**

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Benjamin Novakhov  
geboren am 25.12.1990 in Baku**

## **Gutachter**

- 1. apl. Prof. Dr. med. Amelie Lupp (Institut für Pharmakologie und Toxikologie Jena)**
- 2. PD Dr. med. Brigitte Kaiser (Institut für Pharmakologie und Toxikologie Jena)**
- 3. Prof. em. Dr. med. Karl-Joachim Netter (Institut für Pharmakologie Philipps-Universität Marburg)**

**Tag der öffentlichen Verteidigung: 03. November 2015**

**Tag des Abschlussexamens: 08. November 2016**

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -MSH	$\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes-Hormon
AC	Adenylatcyclase
ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
AK	Antikörper
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	ADP-Ribosylierender Faktor
BNP	Brain Natriuretic Peptide
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläres Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
ECL-Zellen	enterochromaffin-ähnliche Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay
FCS	fetal calf serum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Wachstumshormon
GH-produzierendes Hypophysenadenom	Wachstumshormon-produzierendes Hypophysenadenom
GHRH	Growth-hormone-releasing hormone, Somatoliberin
GIST	gastrointestinaler Stromatumor
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	heterotrimeres GTP-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat

HAT-Medium	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin-Medium
HCC	hepatozelluläres Karzinom
hCG	humanes Choriongonadotropin
HEK-293-Zellen	humane embryonale Nieren-Zellen 293
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
Ig	Immunglobulin
IL-6, IL-10, IL-12	Interleukine (Interleukin-6, Interleukin-10, Interleukin-12)
kDa	Kilodalton
LH	luteinisierendes Hormon
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	mitogen-activated protein kinase
M-CSF	Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
mRNA	messenger-RNA
NET	neuroendokrine Tumore
NGS	normal goat serum, Normales Ziegenserum
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
PAC-1-Rezeptor	PACAP-Rezeptor-1
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PACAP-27	PACAP, bestehend aus 27 Aminosäuren
PACAP-38	PACAP, bestehend aus 38 Aminosäuren
PAM	Peptidyl-Glycin- $\alpha$ -Amididase-Monooxygenase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS/RSA	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Rinderserumalbumin
PEG	Polyethylenglykol

PHI	Peptid-Histidin-Isoleucin
PHM	Peptid-Histidin-Methionin
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PLC $\beta$	Phospholipase C $\beta$
PLD	Phospholipase D
PNS	peripheres Nervensystem
PRP	PACAP-related Peptide
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
PVN	Nucleus paraventricularis
RANK-L	Rezeptor-Aktivator von NF- $\kappa$ B-Ligand
RhoA-GTPase	Ras-GTPase
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
SCN	Nucleus suprachiasmaticus
SDS	sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel- Elektrophorese
SP	Signal-Peptid
Src	sarkomäre Tyrosinkinase
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$
tPA	tissue plasminogen activators
TPBS	Tris-gepufferte Salzlösung mit Thiomersal
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VIPom	VIP-sezernierender neuroendokriner Tumor
VPAC-1-Rezeptor	VIP-/PACAP-Rezeptor-1
VPAC-2-Rezeptor	VIP-/PACAP-Rezeptor-2
WGA	Weizenkeimagglutinin

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>4</b>
2.1	<i>Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)</i>	4
2.1.1	Funktion von VIP	6
2.2	<i>Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)</i>	8
2.2.1	Funktion von PACAP	10
2.3	<i>VIP-Rezeptoren</i>	13
2.3.1	Aufbau und Struktur	13
2.3.2	Signaltransduktion	14
2.3.3	Vorkommen	16
2.4	<i>VIP- und PACAP-Analoga</i>	18
2.5	<i>Antikörper</i>	19
2.5.1	Herstellung monoklonaler Antikörper	21
2.5.2	In dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper	23
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
4.1	<i>Material</i>	25
4.1.1	Lösungen und Standardpuffer	25
4.1.1.1	Immunzytochemie	25
4.1.1.2	Western-Blot	26
4.1.1.3	Immunhistochemie	28
4.1.2	Verwendete Antikörper, Zelllinien, Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen	30
4.1.2.1	Antikörper	30
4.1.2.2	Zelllinien	31
4.1.2.3	Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	31
4.1.2.4	Substanzen für die Immunzytochemie	33
4.1.2.5	Substanzen für die Western-Blot-Analysen	34
4.1.2.6	Substanzen für die Immunhistochemie	35
4.2	<i>Methoden</i>	35
4.2.1	Immunzytochemie	35
4.2.1.1	Durchführung	36
4.2.2	Rezeptoranreicherung aus Zellen und Geweben, SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analysen	37
4.2.2.1	Rezeptoranreicherung aus HEK-293-Zellen	38
4.2.2.2	Aufbereitung der Gewebe	38
4.2.2.3	Isolierung der Rezeptoren mittels WGA-Beads	39

4.2.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	39
4.2.2.5	Western-Blot .....	40
4.2.2.6	Antikörperbehandlung und Nachweis der Proteine .....	40
4.2.2.7	Peptidneutralisation .....	41
4.2.3	Immunhistochemie .....	41
4.2.3.1	Durchführung .....	42
4.2.3.2	Peptidneutralisation .....	45
4.2.3.3	Präparate .....	45
4.2.3.4	Auswertung .....	47
<b>5</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
5.1	<i>Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen</i> .....	49
5.2	<i>Western-Blot-Analysen</i> .....	50
5.2.1	Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen .....	50
5.2.2	Western-Blot-Analysen an normalem Mausgewebe .....	51
5.3	<i>Immunhistochemie</i> .....	52
5.3.1	Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Humangeweben .....	53
5.3.2	Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben .....	56
5.3.3	Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Rattengeweben .....	68
5.3.3.1	Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression des VPAC-1- Rezeptors an normalen Rattengeweben .....	68
5.3.3.2	Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression des VPAC-2- Rezeptors an normalen Rattengeweben .....	70
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
6.1	<i>Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen</i> .....	73
6.2	<i>Western-Blot-Analysen</i> .....	74
6.3	<i>Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Humangeweben</i> .....	76
6.4	<i>Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben</i> .....	81
6.5	<i>Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Rattengeweben</i> .....	88
<b>7</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>101</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>115</b>
9.1	<i>Lebenslauf und Publikation</i> .....	115
9.2	<i>Ehrenwörtliche Erklärung</i> .....	116
9.3	<i>Danksagung</i> .....	117

# **1 Zusammenfassung**

Das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) und das pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) sind Neuropeptide, die beide ein breit gefächertes Wirkspektrum besitzen. Sie sind im menschlichen Körper, aber auch in vielen anderen Spezies, wie in Mäusen und Ratten, in zahlreichen Organen und Geweben zu finden. Die biologischen Effekte dieser Neuropeptide werden über die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren VPAC-1, VPAC-2 und PAC-1 vermittelt, wobei VPAC-1 und VPAC-2 VIP und PACAP mit etwa gleicher und PAC-1 PACAP mit sehr viel höherer Affinität als VIP bindet.

Aus der Literatur ist bereits seit längerem eine Überexpression der VPAC- und PAC-Rezeptoren in einer Vielzahl von Tumoren bekannt, weshalb ihnen eine zunehmende Bedeutung als molekulares Target in der Tumordiagnostik und -therapie zukommt. Doch obwohl bereits zahlreiche Rezeptor-Agonisten und -Antagonisten existieren, haben diese noch keinen Eingang in den Klinik-Alltag gefunden.

Hauptgrund hierfür ist, dass für den notwendigen Nachweis der Rezeptoren bisher größtenteils nur polyklonale Antikörper erhältlich waren, die, bedingt durch ihre Herstellungsweise, nur begrenzt zur Verfügung standen und zum Teil unspezifisch waren, weshalb diese Antikörper für den alltäglichen Gebrauch in der Klinik ungeeignet sind. Aus diesem Grund wurden die monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-1- (141H4L2) und -VPAC-2- (83H1L2) Antikörper entwickelt, die gegen die Carboxy-terminale Sequenz des humanen VPAC-1- bzw. des humanen VPAC-2-Rezeptors gerichtet sind. Da sich die Sequenzen der humanen Rezeptoren nur in einer bzw. in zwei Aminosäuren von denen der Maus und der Ratte unterscheiden, waren Kreuzreaktionen zu erwarten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, sowohl den Anti-VPAC-1- als auch den Anti-VPAC-2-Antikörper detailliert zu charakterisieren und sie hinsichtlich ihrer Spezifität zu beleuchten. Hierfür wurden immunzytochemische Untersuchungen an stabil mit dem VPAC-1 oder VPAC-2 transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen, immunhistochemische Färbungen an normalen Ratten- und Humangeweben sowie an humanen Tumorgeweben und Peptidneutralisationen durchgeführt.

Die Spezifität des monoklonalen Anti-VPAC-1- (141H4L2) bzw. des Anti-VPAC-2- (83H1L2) Antikörpers konnte durch die folgenden Ergebnisse bestätigt werden:

1. Eine membranständige und eine nur geringe intrazelluläre perinukleäre immunzytochemische Färbung der HEK-293-VPAC-1- bzw. der HEK-293-VPAC-2-Zellen durch den entsprechenden Anti-VPAC-1- bzw. Anti-VPAC-2-Antikörper.



2. Die Detektion einer breiten Bande im Bereich von 50 – 100 kDa in Western-Blot-Analysen an HEK-293-VPAC-1-Zellen durch den Anti-VPAC-1-Antikörper und im Bereich von 55 – 100 kDa an HEK-293-VPAC-2-Zellen durch den Anti-VPAC-2-Antikörper.
3. Der Nachweis eines breiten Immunsignals in Western-Blot-Analysen von Präparationen von verschiedenen normalen Mausegeweben im Bereich von 50 – 70 kDa mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper, nicht jedoch mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper.
4. Eine spezifische und größtenteils membranständige Immunfärbung des VPAC-1- und des VPAC-2-Rezeptors in normalen, mit Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Human- und Rattengeweben sowie in humanen Tumorgeweben, wobei die teilweise auftretenden unspezifischen Immunsignale des VPAC-1-Antikörpers sich aufgrund der fehlenden Membranständigkeit leicht erkennen ließen.
5. Die Auslöschung des Immunsignals mittels Neutralisation des Anti-VPAC-1- bzw. des Anti-VPAC-2-Antikörpers mit ihrem jeweiligen antigenen Peptid bei Western-Blot-Analysen und immunhistochemischen Färbungen.

Anschließend wurden der VPAC-1- und der VPAC-2-Rezeptor ausführlich in zahlreichen normalen Human- und Rattengeweben sowie in humanen Tumorgeweben charakterisiert. Der **humane VPAC-1** wurde in Geweben des Magen-Darm-Traktes, in kortikalen Pyramidenzellen, in Ependymzellen des Ventrikelsystems, in Follikelepithelzellen der Schilddrüse, in apikalen Anteilen der Azinuszellmembranen und in Schaltstücken des Pankreas und in B- und T-Lymphozyten der Milz, der Lymphknoten und der Tonsille detektiert. Der **humane VPAC-2** konnte in Geweben des Gastrointestinal-Traktes, auf der apikalen Seite der exokrinen Azinuszellen des Pankreas, in Follikelepithelzellen der Schilddrüse, in B- und T-Lymphozyten der Milz, der Lymphknoten und der Tonsille, in den proximalen Nierentubuli und in Kupffer-Zellen der Leber nachgewiesen werden.

**Im Rattengewebe** ließ sich der **VPAC-1** im Magen-Darm-Trakt, im endokrinen und exokrinen Pankreas, im ventrikulären Plexus choroideus, in kortikalen Pyramiden- und zerebellären Purkinjezellen, in hormonesezernierenden Zellen der Hypophyse, in Nervenzellperikarya der Hinterwurzelganglien und des Rückenmarks, in der Samenblase, im Hoden und im Nebenhoden, im serösen Drüsengewebe der Parotis und der Tränendrüse und in allen Retinaschichten auffinden. Der **VPAC-2** war **im Rattengewebe** in allen

Retinaschichten, in Geweben des Magen-Darm-Traktes, in den Schaltstücken der Glandula parotidea und der Glandula submandibularis, im endokrinen Pankreas, in hepatischen Kupffer-Zellen, in proximalen Nierentubuli, in der Nebennierenrinde sowie in B- und T-Lymphozyten der Milz und des Thymus nachzuweisen.

**Im humanen Tumorgewebe** befand sich der **VPAC-1** hauptsächlich in Schilddrüsen-Karzinomen, in Tumoren des Magen-Darm-Traktes, in Pankreas-Karzinomen, in neuroendokrinen Tumoren, in Rhabdomyo-, Angio- und Osteosarkomen, in Hämangiomen sowie in Ovarial- und Cervix-Karzinomen. Nicht ganz so stark vertreten war der Rezeptor in Hypophysenadenomen, mikronodulären Thymomen, Leiomyosarkomen sowie in Prostata-, Harnblasen- und Mamma-Karzinomen. Der **VPAC-2** ließ sich **in Tumorgeweben** überwiegend in Schilddrüsen-Karzinomen, in Tumoren des Magen-Darm-Traktes, in Angio- sowie in Osteosarkomen, in Hämangiomen und in Mamma-Karzinomen darstellen. Etwas seltener war er auch in Hypophysenadenomen, mikronodulären Thymomen, Pankreas-Karzinomen, neuroendokrinen Tumoren, Rhabdomyo- und pleomorphen Sarkomen, Harnblasen-, Ovarial- und Cervix-Karzinomen aufzufinden.

Insgesamt konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass sich die neu entwickelten monoklonalen Antikörper aufgrund ihrer Spezifität für die Detektion des VPAC-1- bzw. des VPAC-2-Rezeptors eignen. Trotz leichter Unspezifitäten des Anti-VPAC-1-Antikörpers in Western-Blot-Analysen an Geweben und in Teilen der immunhistochemischen Färbungen, ist er für die Rezeptorsuche in Paraffinschnitten geeignet, da die unspezifischen Signale leicht an der fehlenden Membranständigkeit zu erkennen waren. Der Anti-VPAC-2-Antikörper ist für die Diagnostik mittels Western-Blot-Analysen an Zellen und Geweben und immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten ohne Einschränkungen zu empfehlen. Folglich können diese beiden monoklonalen Antikörper zum einen für die weitere Erforschung des VPAC-1- bzw. des VPAC-2-Rezeptors dienlich sein, zum anderen aber auch ein wertvolles Werkzeug in der pathologischen Routinediagnostik zur Ermittlung des Rezeptorexpressionsprofils in Tumoren darstellen.

## 2 Einleitung

### 2.1 Vasoaktives intestinales Peptid (VIP)

Das vasoaktive intestinale Peptid (VIP) ist ein 28 Aminosäuren langes Neuropeptid, das 1970 erstmals aus dem Schweinedünndarm isoliert wurde (Abb. 2) (Fahrenkrug und Emson 1982, Said und Mutt 1970). Es ist strukturell stark verwandt mit dem pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) und gehört zur gleichen Hormonsuperfamilie wie das Peptid-Histidin-Isoleucin (PHI), Peptid-Histidin-Methionin (PHM), Sekretin, Glukagon und Helodermin (Abb. 1) (Dejda et al. 2006).

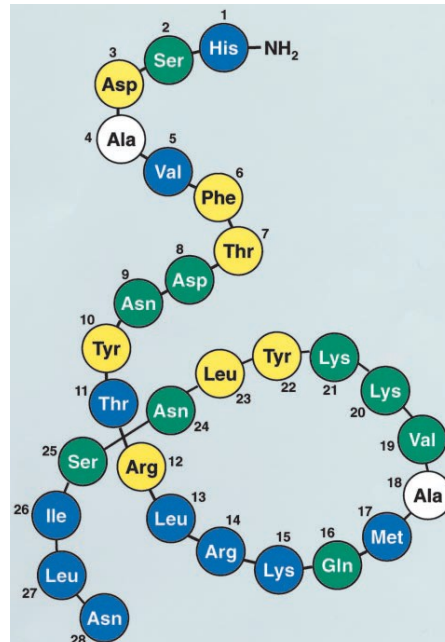
```
PACAP38 HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK-NH2
PACAP27 -----NH2
VIP ---AV---N-T-L-----NSI-N-NH2
Secretin ----T--SEL--L-EGARLQRL-QGLV-NH2
GHRH YA-A---N---KVLG-LSAR-L-QDIMSRQQGESNQERGARARL-NH2
Helodermin ---A---EE--KLLAKL-LQ----SI--S-TSPPP-NH2
Glucagon --Q-T--SD--K-LDSRRAQDFVQWLMNT
GLP-2 -A--S-S-EMNTILDNL-ARDFINWLIQTKITD
PRP DVAH--LNEA-RKVL D-LSAG-H-QSLVA
PHM -A--V--SDF-KLLG-LSA----ESLM-NH2
GIP YAE-T-ISR--IAMDKIHQQDFVNWL-AQKG-KNDWKHNITQ
```

**Abb. 1:** Vergleich der Primärstrukturen mehrerer Peptide. Ein Strich ist gleichbedeutend mit einer gleichen Aminosäure. VIP hat eine große strukturelle Ähnlichkeit mit PACAP, Sekretin, GHRH, Helodermin, Glukagon, GLP-2, PRP, PHM und GIP (nach Vaudry et al. 2009).

Obwohl zuerst aus dem Dünndarm isoliert (Said und Mutt 1970), ist VIP ein weit verbreitetes Peptid im menschlichen Organismus. Peripher kommt es in allen Wandschichten des Magen-Darm-Traktes, in parasymphatischen Ganglien des endokrinen Pankreas, in exokrinen Drüsen, im männlichen (Prostata, glatte Muskulatur des Corpus cavernosum) und weiblichen (Tertiärfollikel) Urogenitaltrakt und in der Brust vor. Aber auch in der Schilddrüse, in der Gallenblase, in der glatten Muskulatur des Respirationstraktes, in der Niere und in der Nebenniere konnte eine Expression von VIP nachgewiesen werden, wobei die höchsten Konzentrationen in der glatten Muskulatur, im Drüsenepithel und um Blutgefäße herum gefunden wurden (Busto et al. 2003, Collado et al. 2004, Fahrenkrug und Emson 1982, Gabbay-Benziv et al. 2012, Vacas et al. 2013, Wei et al. 2007, Winzell und Ahrén 2007, Zhang et al. 2010). Im zentralen Nervensystem ist es in zahlreichen Regionen zu detektieren. Die höchsten Konzentrationen finden sich in allen Schichten des zerebralen Cortex, im Hippocampus, in der Amygdala, im Hypothalamus und in den amakrinen Zellen der Retina (Fahrenkrug und Emson 1982, White et al. 2010). Auch in den Zellkörpern des Ganglion

sphenopalatinum und in den peptidergen skelettalen Nervenfasern wurden nennenswerte Konzentrationen an VIP entdeckt (Csati et al. 2012, Persson und Lerner 2011). Weiterhin wurde es im peripheren Nervensystem und in endokrin-parakrinen Zellen aufgefunden (Valdehita et al. 2007). Eine große Bedeutung wird VIP auch im Immunsystem zugeschrieben. So wird es über peptiderge Nervenfasern in naher Nachbarschaft zu Immunzellen im Thymus, in der Milz, in den Peyer-Plaques und im mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT) des Gastrointestinal-Traktes und des Lungengewebes freigesetzt. Außerdem ist das Peptid Bestandteil der Mastzellgranula. Eine Expression von VIP findet sich auch in B- und T-Lymphozyten sowie in den verschiedenen Thymozyten ( $CD4^+CD8^+$ ,  $CD4^+CD8^-$  und  $CD4^-CD8^+$ ). Ebenso erwähnenswert ist die Produktion in  $CD4^+$  Th2- und  $CD8^+$  T2-Zellen (Pozo 2003).

VIP wird aus einem 170 Aminosäuren langen Präpro-VIP synthetisiert (Gabbay-Benziv et al. 2012). Aus dieser Aminosäuresequenz heraus entstehen post-translational neben VIP (Abb. 2) auch die dem VIP sehr ähnlichen Peptide PHI (bei den meisten Säugetieren) bzw. das äquivalente PHM (nur beim Menschen) (Vaudry et al. 2000, White et al. 2010).



**Abb. 2:** Primärstruktur des vasoaktiven intestinalen Peptids. VIP besteht aus 28 Aminosäuren, zwei  $\beta$ -Bögen (Aminosäuren 2–5 und 7–10) und einer  $\alpha$ -Helix (Aminosäuren 11–26) (nach Igarashi et al. 2002).

### 2.1.1 Funktion von VIP

VIP besitzt als Neurotransmitter zahlreiche physiologische und pathophysiologische Funktionen, die hauptsächlich über seine beiden Rezeptoren VPAC-1 und VPAC-2 sowie (mit geringerer Affinität) über den PACAP-Rezeptor PAC-1 vermittelt werden (Igarashi et al. 2002, White et al. 2010).

Im ZNS wurde beobachtet, dass es nach Applikation von VIP an bestimmte Orte, wie z.B. dem zerebralen Cortex, dem Hippocampus, dem Rückenmark und Teilen der Pyramidenbahn, zu einer Depolarisation und neuronalen Aktivität kommt. Hierfür waren nur kleinste Konzentrationen im Bereich von 0,1 fmol je sec nötig. Besonders im zerebralen Cortex aktiviert VIP den Glykogen-Stoffwechsel. Es moduliert desweiteren die astrozytäre Proliferation sowie die astrozytäre Plastizität und die Biosynthese neurotropher Faktoren und Gliotransmitter. Außerdem ist VIP in der Lage, die Durchblutung des Gehirns durch eine Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäßwände zu erhöhen. Nach einer zerebralen Ischämie bewirkt VIP einen Anstieg von VEGF und unterstützt damit die Angiogenese. Daneben ist es neuroprotektiv. Im hypothalamo-hypophysären System könnte VIP die Funktion eines regulativen neuroendokrinen Releasing-Factors besitzen, weil es den peripheren Prolaktin-Spiegel signifikant erhöht, die Sekretion von LH oder FSH jedoch nicht beeinflusst. Weiterhin stimuliert VIP die Freisetzung von  $\alpha$ -MSH ( $\alpha$ -Melanozyten-stimulierendes Hormon) und beeinflusst den zirkadianen Rhythmus sowie damit verbundene Parameter wie lokomotorische Aktivität, Herzrhythmus und Körperkerntemperatur entscheidend mit (Fahrenkrug und Emson 1982, Ghourab et al. 2011, Hannibal et al. 2011, Masmoudi-Kouki et al. 2007, White et al. 2010, Yang et al. 2013).

In Speicheldrüsen, insbesondere in der Glandula submandibularis, erhöht VIP den intraglandulären Blutfluss durch eine Vasodilatation. Obwohl das Neuropeptid keine Speichelsekretion verursacht, scheint es durch eine Beeinflussung des duktales Systems auf die Zusammensetzung des Speichels einzuwirken (Fahrenkrug und Emson 1982).

Im Vorhof und Ventrikel des Herzens übt VIP einen starken positiv inotropen Effekt über die kardialen Trabekel aus (Saetrum Opgaard et al. 2001).

Im Respirationstrakt bewirkt der Neurotransmitter eine Vasodilatation der nasalen Blutgefäße in der Mukosa. Zudem bewirkt es durch seine inhibitorische Transmitteraktivität eine Relaxation der trachealen glatten Muskulatur. Auch in den übrigen Abschnitten der Lunge ist VIP für eine Vasodilatation, eine Relaxation glatter Muskulatur und für eine Stimulation der Mukussekretion verantwortlich. Weiterhin besitzt es in der Lunge eine anti-inflammatorische

Aktivität und moduliert die Proliferation glatter Muskelzellen (Busto et al. 2003, Fahrenkrug und Emson 1982).

Im Magen beeinflusst VIP hauptsächlich die glatte Muskulatur von Korpus und Fundus im Sinne einer Relaxation. Zusätzlich inhibiert es die Kontraktion des Pylorus, wodurch der Pylorussphinkter-Tonus sinkt und der transpylorische Fluss steigt. Auch die glatte Muskulatur der Gallenblase wird durch VIP relaxiert. Die Hauptzellen werden durch VIP zur Sekretion von Pepsinogen angeregt (Fahrenkrug und Emson 1982, Wei et al. 2007, White et al. 2010).

Im Dün- und Dickdarm wirkt VIP über Axone, die ihren Ursprung im Plexus Myentericus haben, inhibitorisch auf die zirkuläre glatte Muskelschicht, sodass aboral eine Relaxation erfolgt. Weiterhin sorgt es während der Verdauung für eine Vasodilatation und Hyperämie der Dünndarm-Mukosa und im Rahmen der Defäkation für eine verstärkte Durchblutung der Kolon-Mukosa. Zusätzlich kommt es durch VIP zur Sekretion von Wasser und Elektrolyten in den Darm (Fahrenkrug und Emson 1982, White et al. 2010).

Im exokrinen Anteil des Pankreas stimuliert VIP die Sekretion von Pankreasflüssigkeit und Bikarbonat, jedoch nicht die von Enzymen. Im endokrinen Anteil wird Glucose-abhängig die Freisetzung von Insulin und Glukagon stimuliert (Fahrenkrug und Emson 1982, Winzell und Ahrén 2007).

Auch im männlichen und weiblichen Urogenitaltrakt hat VIP Effekte auf Blutgefäße, die glatte Muskulatur und auf Epithelzellen. In der Harnblase und im Ureter kommt es durch VIP zur Relaxation der glatten Muskulatur. Im Vas deferens inhibiert es die Kontraktion und im Corpus cavernosum führt es ebenfalls zu einer Relaxation der glatten Muskelzellen. So verbessert VIP die erektile Funktion dosisabhängig (Fahrenkrug und Emson 1982, Hernández et al. 2004, Hernández et al. 2006, Zhang et al. 2010). Im Myometrium des Uterus inhibiert es die myoelektrische Aktivität und glattmuskuläre Kontraktion und wird in der Plazenta hauptsächlich von Trophoblast-Riesenzellen sezerniert. Bei intravenöser Gabe inhibiert VIP die uterine glattmuskuläre Aktivität komplett. Zusätzlich dazu erhöht es den Blutfluss im Myometrium und in der Vagina. Durch hochschwellige pelvine nervale Stimulation wird VIP lokal freigesetzt. Ein systemischer Anstieg des Neurotransmitters ergibt sich durch die sexuelle Stimulation der Frau mit dem damit verbundenen erhöhten Blutfluss in der Vagina (Fahrenkrug und Emson 1982, Hauk et al. 2014).

Im Immunsystem spielt VIP eine modulierende Rolle. Wird es aus Nervenfasern und Immunzellen freigesetzt, ist es durch die Regulation der Produktion von pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren ein potenter anti-inflammatorischer Faktor (White et al. 2010). So wirkt VIP, neben PACAP, unter anderem bei der Th2-Zell-Differenzierung unterstützend

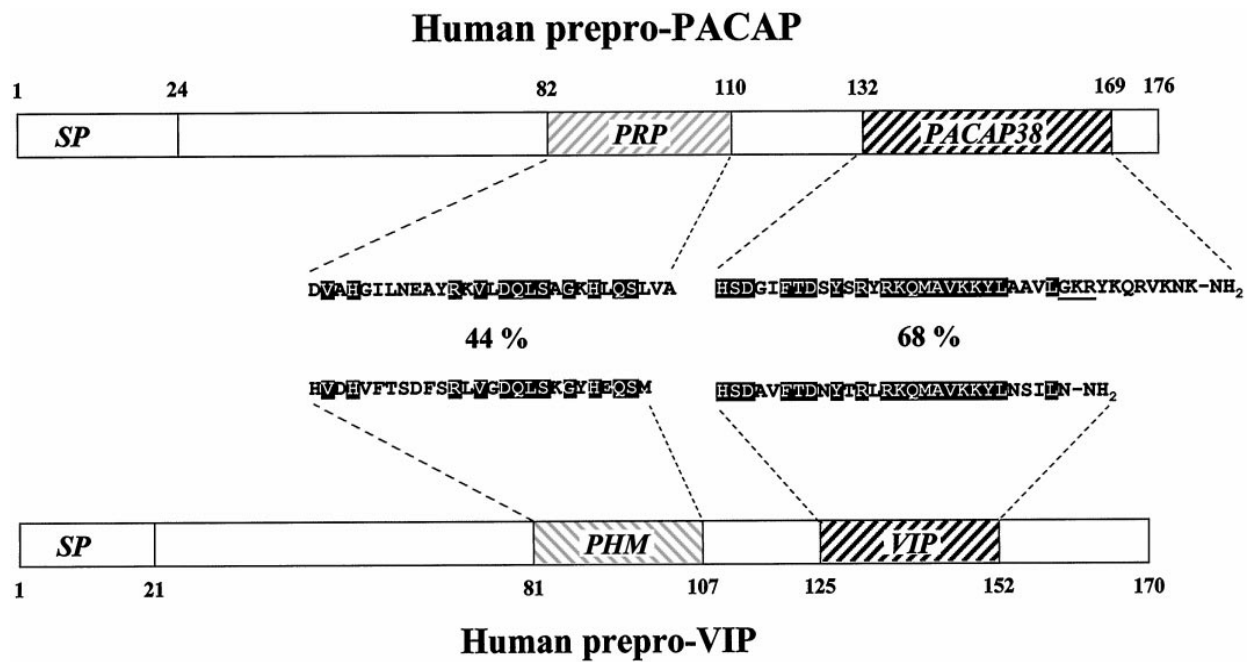
mit, inhibiert die TNF- $\alpha$  (Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ )-Produktion, die neutrophile Chemotaxis und die Th1-Zell-Differenzierung (Kim et al. 2000, Pozo 2003, Vaudry et al. 2009).

VIP greift weiterhin in den Knochenstoffwechsel ein, indem es die RANK-L-Expression (Rezeptor-Aktivator von NF- $\kappa$ B-Ligand) stimuliert, die Produktion von Osteoprotegerin und M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor) jedoch inhibiert und somit das Knochenremodelling beeinflusst (Persson und Lerner 2011).

VIP scheint auch eine wichtige Rolle in neoplastischen Geweben zu spielen. So wurde beobachtet, dass es durch VIP zu einem Anstieg von EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) in Mamma-Karzinomen kommt, was mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Valdehita et al. 2009). Auch kommt es in Lungen-, Mamma- und Prostata-Karzinomen zu einem Anstieg von VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Dies ist ebenso mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf verbunden, da VEGF essentiell für das Tumorwachstum sowie die Metastasierung ist. So wird das proangiogene Potential von VIP in Tumoren zusätzlich unterstrichen. In vielen anderen Tumoren, wie z.B. in Prostata-Karzinomen, wirkt das Neuropeptid autokrin und parakrin und ist ein trophischer Faktor, der Tumorzellen vor der Apoptose schützt oder ihre neuroendokrine Differenzierung induziert (Collado et al. 2004, Gutiérrez-Cañas et al. 2005, Valdehita et al. 2007). So ist VIP ein autokrin wirkender Wachstumsfaktor für einige Klein- und Nicht-Kleinzellige Bronchial-Karzinome, für andere wiederum wurde ein wachstumshemmender Effekt beobachtet (Busto et al. 2003). In klarzelligen Nierenzell-Karzinomen wurde festgestellt, dass VIP den oxidativen Stress erhöht und somit die Metastasierung eindämmt (Vacas et al. 2013).

## **2.2 Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP)**

Das pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) ist ein carboxyterminal  $\alpha$ -amidiertes Neuropeptid, welches 1989 erstmals im ovinen Hypothalamus entdeckt wurde (Miyata et al. 1989). Es besteht aus 38 Aminosäuren und gehört zur gleichen Hormonsuperfamilie wie VIP, Sekretin, das Growth-hormone-releasing hormone (GHRH, Somatoliberein) und Glukagon (Vaudry et al. 2009). So sind z.B. 68 % der Aminosäuren in der Primärstruktur von PACAP-38 und VIP gleich (Abb. 3) (Vaudry et al. 2000).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung des humanen Präpro-PACAP und des humanen Präpro-VIP. SP: Signal-Peptid. PRP: PACAP-related Peptide. PHM: Peptid-Histidin-Methionin. Die Primärstrukturen von PACAP-38 und VIP ähneln sich in 68 % der Aminosäuren (nach Vaudry et al. 2000).

Zuerst im zentralen Nervensystem (ZNS) isoliert, ist PACAP hier auch weit verbreitet. Es findet sich im Bulbus olfactorius, in Abschnitten des cerebralen Cortex und der Neurohypophyse, aber auch subkortikal, im Septum, in der Amygdala, im Hippocampus, Epithalamus, Hypothalamus und Thalamus, in Teilen des ventrikulären Systems, im Mittel- und Kleinhirn, im Plexus choroideus, im Hirnstamm und in der Medulla oblongata.

Weiterhin wurde PACAP in großen Teilen des peripheren Nervensystems (PNS) und weiterer peripherer Gewebe entdeckt. Dazu zählen Abschnitte des Auges und sowohl Mark als auch Rinde der Nebenniere, der Hypophysenvorderlappen, endokrine und exokrine Pankreasanteile, weite Teile der männlichen und weiblichen Gonaden, die Brustdrüse, die Harnwege, der Respirationstrakt, glatte Muskulatur und Ganglien der Submukosa im Magen-Darm-Trakt, Gewebe des Immunsystems und Nervenfasern in der Haut (Vaudry et al. 2009).

PACAP wird in zwei unterschiedlichen gewebespezifischen Polypeptiden exprimiert, PACAP-38 (38 Aminosäuren) und PACAP-27 (27 Aminosäuren), wobei beide Isoformen durch proteolytische Spaltung des gleichen 127 Aminosäuren langen Peptids entstehen (Morelli et al. 2008) und ihren Ursprung im gleichen Gen und mRNA-Vorläufer haben. Auch ist die adenylatcyclase (AC)-stimulierende Aktivität bei beiden Formen gleichwertig (Basille et al. 2006, Zhou et al. 2011).



PACAP entsteht durch die post-translationale Prozessierung des humanen 175 Aminosäuren langen Präpro-PACAPs. Mittels Prohormonkonvertasen werden ein PACAP-ähnliches Peptid (PRP, PACAP-related Peptide) und PACAP-39 am C-terminalen Ende abgespalten. PACAP-39 wird schließlich C-terminal durch die Peptidyl-Glycin- $\alpha$ -Amididase-Monooxygenase (PAM) amidiert, wodurch PACAP-38 entsteht. Durch Abspaltung der carboxyterminalen 11 Aminosäuren wird alternativ gewebespezifisch PACAP-27 gebildet, welches C-terminal ebenfalls  $\alpha$ -amidiert vorliegt (Davis-Taber et al. 2008, Vaudry et al. 2000).

Im ZNS ist PACAP-38 die vorherrschende Isoform (90 %), wohingegen PACAP-27 hier mit einem Anteil von nur 10 % deutlich seltener aufzufinden ist. Auch im PNS und in peripheren Geweben ist PACAP-38 generell häufiger als PACAP-27 vertreten, jedoch variiert die Verteilung gewebeabhängig, was auf die unterschiedliche Expression der spaltenden Prohormonkonvertasen zurückzuführen ist (Vaudry et al. 2009). So gibt es im Pankreas hauptsächlich PACAP-38 (Ahrén 2008). Auch im Colon werden nur bis zu 30 % PACAP-27 exprimiert und im Hoden ist ebenfalls fast kein PACAP-27 zu detektieren (Vaudry et al. 2009).

### **2.2.1 Funktion von PACAP**

Die pleiotropen biologischen Effekte von PACAP werden über drei verschiedene Rezeptoren vermittelt: PAC-1, VPAC-1 und VPAC-2 (Vaudry et al. 2009). Die einzelnen Rezeptoren werden in Kapitel 2.3 näher beschrieben.

PACAP besitzt zahlreiche modulatorische Effekte im ZNS und wirkt auf viele Zellen sowohl neurotroph als auch neuroprotektiv (Basille et al. 2006, Vaudry et al. 2009). Im Hypothalamus steuert PACAP über den cAMP/PKA-Signalweg in magnozellulären Neuronen des Nucleus supraopticus und des Nucleus paraventricularis (PVN) die Freisetzung von Oxytocin und Vasopressin. Ferner lassen die im Tagesverlauf unterschiedlichen Konzentrationen von PACAP bzw. PACAP-Rezeptoren im Nucleus suprachiasmaticus (SCN) darauf schließen, dass das Neuropeptid eine entscheidende Rolle in der zirkadianen Rhythmuskontrolle einnimmt. Dies lässt sich ebenso in der Epiphyse feststellen, wo die Melatonin-Synthese durch PACAP getriggert wird. Auch wurde beobachtet, dass durch erhöhte PACAP-Spiegel das Hungergefühl abnimmt und das Durstempfinden steigt. Weiterhin wirkt es als Neurotransmitter des hypothalamo-hypophysären Systems. So stimuliert PACAP über einen cAMP- und  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg die Freisetzung von GH, ACTH, LH, FSH, Prolaktin, TSH und  $\alpha$ -MSH. Gleichzeitig kommt es durch diese Hormone zu einem peripheren Anstieg von PACAP.

Das Neuropeptid PACAP besitzt auch in peripheren Organen zahlreiche Funktionen. In der Schilddrüse erhöht es durch eine gesteigerte cAMP-Produktion die Freisetzung von Thyroxin. Das Wachstum der männlichen Gonaden wird durch PACAP beschleunigt; es stimuliert die Sekretion von Testosteron durch die Leydig-Zellen, wohingegen die Sertoli-Zellen durch einen cAMP-Anstieg zur Freisetzung von Estradiol und Inhibin angeregt werden. Auch in den Tubuluszellen des Nebenhodens ist PACAP lokalisiert und wirkt dort parakrin auf die Spermienreifung ein. Im Corpus cavernosum ist es mitverantwortlich für die Erektion, wodurch sich ein therapeutischer Ansatz ergeben könnte. In den weiblichen Gonaden ist PACAP in Granulosa- und Cumulus-Zellen großer präovulatorischer Follikel an einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Produktion von Progesteron mitbeteiligt. Weiterhin kommt es durch humanes Choriongonadotropin (hCG) zu einer Zunahme des peripheren PACAP-Spiegels. Auch hat PACAP einen höheren Einfluss auf den cAMP-Anstieg in luteinisierenden Granulosa-Zellen als LH, sichert deren Überleben und erhöht die Expression des tissue plasminogen activators (tPA). Weiterhin verhindert es die Follikel-Apoptose und wirkt auf die glatte Muskulatur und auf die Gefäße des weiblichen Reproduktionstraktes relaxierend.

In den chromaffinen Zellen der Nebenniere bewirkt PACAP über einen cAMP- und  $Ca^{2+}$ -Anstieg eine Katecholamin-, BNP- (Brain Natriuretic Peptide), Enkephalin- und VIP-Sekretion. Desweiteren ist durch PACAP, was in der Nebenniere eine autokrin-parakrine Wirkungsweise hat, eine speziesabhängige Erhöhung des Cortisol-, Corticosteron- und Aldosteronlevels zu verzeichnen (Conconi et al. 2006, Vaudry et al. 2009).

Zahlreiche Effekte übt das Neuropeptid auf den gesamten Verdauungstrakt aus. Die Glandula submandibularis und die Parotis werden durch PACAP zur Speichelsekretion angeregt. Im Rattenmagen inhibiert es die histamin-induzierte Salzsäure-Sekretion und in der Magenmukosa wird die Histamin-Synthese, dessen Freisetzung aus enterochromaffin-ähnlichen Zellen (ECL-Zellen) und die Proliferation dieser Zellpopulation stimuliert. Weiterhin reguliert PACAP lokal die Sekretion von ANP, Gastrin und Somatostatin und stimuliert im gesamten Gastrointestinal-Trakt die exokrine Sekretion. Im Duodenum wird die Bicarbonat-Synthese getriggert und im distalen Colon über cholinerge und nicht-cholinerge Neurone eine Chlorid-Sekretion gesteuert. Über unterschiedliche Mechanismen hat PACAP überwiegend einen relaxierenden Effekt auf die gastrointestinale glatte Muskulatur. In der Leber wirkt es über seine lipolytische Funktion der Fetteinlagerung entgegen und führt durch die Bereitstellung von Glukose zu einer potenteren Hyperglykämie als VIP. Im Pankreas kommt es durch die elektrische Stimulation des Vagusnervs zu einer Freisetzung von PACAP.

Das Neuropeptid triggert über den Adenylatzyklase-Signalweg die Sekretion von Amylase, Lipase, Pankreassaft, Bikarbonat und Proteinen. Durch eine PACAP-induzierte Vasodilatation kommt es zu einer vermehrten pankreatischen Durchblutung, was sich insbesondere im exokrinen Pankreasanteil bemerkbar macht. Im endokrinen Anteil führt es, potenter als VIP, zu einer vermehrten Insulin- und Glukagonausschüttung, was der ständigen Kontrolle von Somatostatin unterliegt.

Im Respirationstrakt relaxiert PACAP, ebenso wie VIP, die glatte Muskulatur der Trachea, führt zu einer Bronchodilatation und erhöht den nasalen Atemwiderstand. Weiterhin sorgt PACAP postnatal für einen normalen Gefäßtonus der Lunge, was eine pulmonale Hypertension verhindert. Durch die potente Chlorid-Sekretion hat das Peptid auch entscheidenden Einfluss auf die Mukus-Produktion. Ferner besitzt es antiapoptotische und der Zytotoxizität von Schadstoffen entgegengesetzte Wirkungen im Alveolargewebe. Auf diesen protektiven Effekten von PACAP (und VIP) basierend wurden bereits Peptid-Analoga zur Behandlung des Asthmas entwickelt.

Im Gefäßsystem führt PACAP über einen cAMP-Anstieg, ähnlich wie VIP, zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäßwände und wirkt so vasorelaxierend, wodurch in den betroffenen Organen der Blutfluss steigt und der mittlere arterielle Druck sinkt. Weiterhin regt es die Produktion von vascular endothelial growth factor (VEGF) an, was einen großen Einfluss auf die Angiogenese und die Gefäßpermeabilität nimmt. Im Herzen kann PACAP die Kardiomyozyten direkt stimulieren und wirkt positiv inotrop, chronotrop und dromotrop, was therapeutisch nutzbar gemacht werden kann.

Desweiteren ist dieses Peptid ein wichtiges immunmodulatorisches Molekül, das viele pro- und antiinflammatorische Wirkungen aufweist und deswegen therapeutisch interessant ist (Harfi et al. 2004, Vaudry et al. 2009). In Mastzellen stimuliert es die Histamin- und Serotoninfreisetzung und in  $CD4^+CD8^+$ -Thymozyten inhibiert es eine Glukokortikoid-induzierte Apoptose. Weiterhin vermindert PACAP, ebenso wie VIP, die neutrophile Chemotaxis. Im Modell des septischen Schocks reduziert es die Leukozyten-Infiltration in die betroffenen Organe und die Behandlung chronisch inflammatorischer Krankheiten mit PACAP führte im Tiermodell zu einer Symptomverbesserung und Änderung des Zytokinprofils. Diese Effekte sind jedoch komplex und können je nach Organ oder Ausgangslage des Organismus und Immunsystems sehr unterschiedlich ausfallen. So kann PACAP, wie auch VIP, den TNF- $\alpha$ -Spiegel zwar erhöhen, ihn aber auch senken (Kim et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Ähnliches ist auch bei den Interleukinen (z.B. IL-6, IL-10 oder IL-12) zu beobachten.

Im Knochenstoffwechsel ist PACAP für die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen osteoanabolen und osteokatabolen Prozessen verantwortlich. Über einen cAMP-Anstieg führt es zu einer erhöhten Produktion von IL-6 und wirkt somit knochenresorptiv. Es kann aber auch die Osteoklastogenese inhibieren und auf diese Weise der Knochenresorption entgegenwirken.

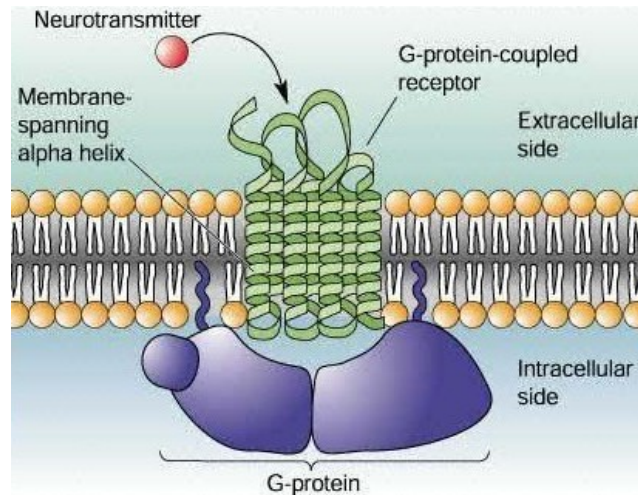
Da dieses Neuropeptid auch in vielen Tumoren zu beobachten ist, ist ein breites Wirkspektrum zu verzeichnen. So kann es die Proliferation einiger Tumorzellen stimulieren, aber auch inhibieren. Außerdem ist zu beobachten, dass es einigen Tumorzellen das Überleben sichert oder deren Hormonsekretion erhöht (Vaudry et al. 2009).

## **2.3 VIP-Rezeptoren**

### **2.3.1 Aufbau und Struktur**

PACAP und VIP üben ihre biologischen Effekte über eine Aktivierung der drei G-Proteingekoppelten Rezeptoren VPAC-1, VPAC-2 und PAC-1 aus (Dickson und Finlayson 2009). Der humane VPAC-1-Rezeptor wurde erstmals 1993 von Sreedharan aus einer Colon-Karzinom-Zelllinie isoliert (Sreedharan et al. 1993). Nur ein Jahr darauf, 1994, wurde der hVPAC-2-Rezeptor aus T-Lymphozyten geklont (Svoboda et al. 1994). Der hPAC-1-Rezeptor wiederum wurde 1993 von Ogi und Kollegen (Ogi et al. 1993) im Hypophysengewebe aufgefunden. Die jeweiligen Rezeptoren wurden in den 90er Jahren meist kurz vorher auch aus Maus- und Rattengewebe isoliert (Dickson und Finlayson 2009). Von allen drei Rezeptoren sind Splice-Varianten bekannt, jedoch ist deren funktionelle Relevanz bei VPAC-1 und bei VPAC-2 noch nicht vollständig verstanden, wohingegen die Splice-Varianten des PAC-1-Rezeptors komplex und funktionell wichtig zu sein scheinen (Harmar et al. 2012).

VPAC-1, VPAC-2 und PAC-1 gehören zur kleinen Familie der Klasse-B1-G-Proteingekoppelten Rezeptoren (Couvineau und Laburthe 2012a, b). Wie alle G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) haben auch diese sieben transmembranäre  $\alpha$ -helikale Segmente, verbunden durch alternierende intra- und extrazelluläre Loops. Extrazellulär befindet sich eine große N-terminale Domäne. Diese ist mit ihrem Aufbau für die spezifische Bindung des Liganden verantwortlich. An der intrazellulären C-terminalen Domäne ist der Rezeptor an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt, über welches eine absteigende Signalkaskade ausgelöst wird (Abb. 4, Gether 2000, Langer 2012).



**Abb. 4:** Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Er besteht aus sieben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen, einem N-Terminus auf der extrazellulären Seite, an den der Ligand (im Schema: Neurotransmitter) bindet, und aus einem intrazellulären C-Terminus, der an ein heterotrimeres G-Protein gekoppelt ist, über welches die Signaltransduktion vermittelt wird (<http://thedarkpark.wordpress.com/2012/01/03/cellular-response-times-depend-upon-a-hormones-method-of-action>).

Die VPAC-Subtypen unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer Größe: Der VPAC-1 ist 457 und der VPAC-2 438 Aminosäuren lang. Jedoch befindet sich auch der PAC-1 mit einer Länge von 525 Aminosäuren in einer ähnlichen Größenordnung. Die molekulare Masse von VPAC-1 liegt zwischen 55 und 70 kDa, die von VPAC-2 im Bereich von 50 und 65 kDa und die von PAC-1 zwischen 40 und 60 kDa (Schulz et al. 2004).

### 2.3.2 Signaltransduktion

Zur Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren VPAC-1, VPAC-2 und PAC-1 bedarf es der Bindung der Liganden PACAP-27, PACAP-38 oder VIP. Die Bindungsaffinität der einzelnen Rezeptoren zu ihren natürlich vorkommenden Liganden sieht dabei folgendermaßen aus: für VPAC-1:  $VIP = PACAP-27 \leq PACAP-38$ ; für VPAC-2:  $VIP = PACAP-27 = PACAP-38$ ; für PAC-1:  $PACAP-38 = PACAP-27 \gg \gg VIP$  (Granoth et al. 2000). Dabei liegt die Bindungsaffinität ( $EC_{50}$ -Werte) von VIP, PACAP-27 und PACAP-38 für VPAC-1 bei 0,01 – 0,1 nM, für VPAC-2 bei etwa 10 nM und von PACAP bzw. von VIP für den PAC-1-Rezeptor bei 0,2 nM bzw. bei 40 nM (Dickson und Finlayson 2009).

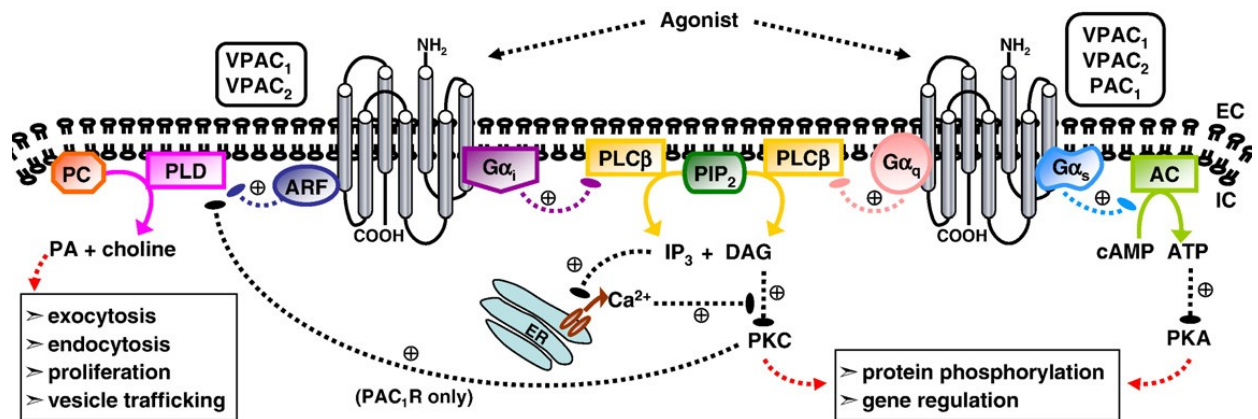
Nach Bindung ihres Liganden durchlaufen die Rezeptoren eine Konformationsänderung, was eine Interaktion der zyttoplasmatischen Domäne mit dem heterotrimeren G-Protein (bestehend aus einer  $\alpha$ -, einer  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit) erlaubt. Dadurch kommt es auf der  $G\alpha$ -

Untereinheit zum Austausch von GDP gegen GTP, was die Dissoziation der GTP-gebundenen  $G\alpha$ -Untereinheit vom  $G\beta\gamma$ -Dimer initiiert und die Signalkaskade aktiviert. Durch Hydrolyse des  $G\alpha$ -gebundenen GTP kommt es schließlich zum Signalstopp und der Wiederherstellung des inaktiven trimeren Komplexes. Meist sind VPAC-Rezeptoren an ein  $G\alpha_s$  gebunden, was zur Aktivierung der Adenylatcyclase, einer Akkumulation von cAMP und der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt (Abb. 5). Dies ist assoziiert mit einem Proliferationssignal, mit der Differenzierung neuroendokriner Zellen im Normal- und Tumorgewebe und der Auslösung anti-inflammatorischer Effekte durch Regulation verschiedener Signalwege und Transkriptionsfaktoren.

Neben der PKA wird mit der Kopplung der Rezeptoren an  $G\alpha_i$  oder  $G\alpha_q$  auch die Phospholipase C (PLC) stimuliert, was einen Anstieg des intrazellulären Calciums ( $[Ca^{2+}]_i$ ) zur Folge hat.

G-Protein-unabhängig ist die Aktivierung der Phospholipase D (PLD). Hierbei ist der VPAC-1- bzw. der VPAC-2-Rezeptor an den ADP-Ribosylierenden Faktor (ARF) gebunden (Langer 2012).

Möglicherweise über den VPAC-2-Rezeptor sind VIP und PACAP in der Lage, bei Bindung an  $G_{i1-2}$  die  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-abhängige NO-Synthase zu aktivieren und die Phosphorylierung der zytosolischen Phospholipase A2 zu inhibieren, was mit der Produktion von cAMP und cGMP einhergeht (Laburthe und Couvineau 2002). Weiterhin können die Rezeptoren über verschiedene Signalwege die Tyrosinkinase, Calciumkanäle, RhoA-GTPasen, die MAPK und Src in ihrer Aktivität sowie die Freisetzung von Kohlenstoffmonoxid modulieren (Dickson und Finlayson 2009).



**Abb. 5:** Schematische Darstellung der bedeutendsten Signalwege des VPAC-1-, VPAC-2- und PAC-1-Rezeptors. In den meisten Fällen führt die Bindung an ein  $G\alpha_s$ -Protein zur Aktivierung der Adenylatcyclase (AC), einem Anstieg von cAMP und der Aktivierung der Proteinkinase A (PKA). Daneben existiert auch noch die Möglichkeit der Bindung an ein  $G\alpha_i$ - oder ein  $G\alpha_q$ -Protein, mit konsekutiver Aktivierung der Phospholipase C $\beta$  (PLC $\beta$ ) und einem Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Spiegels oder der Aktivierung der Phospholipase D (PLD) durch einen ADP-Ribosylierenden Faktor (ARF). Am Ende dieser Signalkaskaden stehen zahlreiche intra- und extrazelluläre Effekte, wie Protein-Phosphorylierungen, Gen-Regulationen oder Transportaufgaben (nach Dickson und Finlayson 2009).

### 2.3.3 Vorkommen

Der **VPAC-1-Rezeptor** wird unter anderem in verschiedenen Regionen des Gehirns, im Mark des Thymus, im Herzen, in der Lunge, in den Nieren, in Mark und Rinde der Nebenniere, im Dünndarm, in der Leber, im Pankreas, in der Prostata, in den Leydig-Zellen des Hodens, im Uterus, im Ovar, in der Mamma, in der weißen Pulpa der Milz, in der Mukosa und in myenterischen Neuronen des Gastrointestinal-Traktes, auf Lymphozyten in Lymphknoten und in nahezu allen humanen epithelialen Geweben exprimiert.

Genaue Lokalisationen des Rezeptors im ZNS sind der Hippocampus, der pyriforme und der zerebrale Cortex, der Gyrus dentatus, der laterale Amygdala-Kern, das Putamen, der Nucleus supraopticus, der Plexus choroideus und die Epiphyse.

Eine spezifische Expression im Immunsystem wurde auf  $CD4^+$ - und  $CD8^+$ -Thymozyten, auf peripheren unstimulierten T-Lymphozyten, auf B-Lymphozyten, auf dendritischen Zellen, auf Mastzellen sowie auf Makrophagen beobachtet (Bajo et al. 2000, Dickson und Finlayson 2009, Goetzl 2006, Harmar et al. 2004, Jamen et al. 2002, Karacay et al. 2001, Schulz et al. 2004, Vaccari et al. 2006).

Der **VPAC-2-Rezeptor** wurde im ZNS, in Blutgefäßen und in der glatten Muskulatur verschiedener Gewebe, in neuroendokrinen Zellen, in der Retina, in Schilddrüsen-Follikelzellen, in der Nebenniere, in der Lunge, im exokrinen und endokrinen Pankreas, im Kolon, in der Prostata, in der Tunica albuginea des Hodens, im Corpus cavernosum des Penis, im Uterus und im Ovar vorgefunden.

Spezifische Expressionsorte im ZNS sind der Hippocampus, der Thalamus, der Nucleus suprachiasmaticus, der Bulbus olfactorius, der zerebrale Cortex, der Nucleus periventricularis, der Hypothalamus und die Amygdala. In vielen Arealen des ZNS werden der VPAC-1- und der VPAC-2-Rezeptor auch koexprimiert.

Im Immunsystem wurde der VPAC-2-Rezeptor auf stimulierten T-Lymphozyten, auf dendritischen Zellen, auf Mastzellen und auf Makrophagen vorgefunden (Bajo et al. 2000, Busto et al. 1999, Conconi et al. 2006, Dickson und Finlayson 2009, García-Fernández et al. 2003, Goetzl 2006, Harmar et al. 2004, Jamen et al. 2002, Langer 2012, Schulz et al. 2004, Vaccari et al. 2006).

Der **PAC-1-Rezeptor** wurde in der Hypophyse, in der Lunge, im mukosa-assoziierten Immunsystem und in myenterischen Neuronen des Darmes, im Nebennierenmark, im Pankreas, in der Prostata, im Uterus, im Hoden und im Nebenhoden aufgefunden (Conconi et al. 2006, Dickson und Finlayson 2009, García-Fernández et al. 2003, Jamen et al. 2002, Schulz et al. 2004).

Im ZNS wird der PAC-1-Rezeptor im Bulbus olfactorius, im Hippocampus, in der Area postrema, in den zerebralen, zerebellären, cingulären und entorhinalen Kortices, im Hypothalamus, in der Amygdala, im Thalamus, in den Raphe-Kernen und im Nucleus suprachiasmaticus exprimiert (Dickson und Finlayson 2009, Kalamatianos et al. 2004).

Der PAC-1-Rezeptor wurde im Immunsystem nur selten aufgefunden, am häufigsten in Makrophagen.

In einer Vielzahl von **Tumorgeweben** werden die VPAC- und PAC-Rezeptoren stark exprimiert. Der **VPAC-1** wird hierbei am häufigsten vorgefunden (Dickson und Finlayson 2009). Fast immer wird VPAC-1 in Glioblastomen, GH-produzierenden Hypophysenadenomen, Mamma-, Prostata-, Harnblasen- und kolorektalen Adenokarzinomen, häufig in Pankreas-, Lungen-, Magen- (sowohl diffus als auch intestinal) und hepatozellulären Karzinomen (HCC), seltener in Karzinoiden, Meningiomen und Ovarialkarzinomen exprimiert (Schulz et al. 2004, Zhang et al. 2007).



Seltener wird der **VPAC-2-Rezeptor** in Tumorgeweben exprimiert, meist in Leiomyomen und in Gastrointestinalen Stromatumoren (GIST, in 16 von 19 Fällen) (Dickson und Finlayson 2009, Reubi et al. 2004), aber auch in Glioblastomen, Meningiomen, Karzinoiden, Phäochromozytomen, Magen-, Mamma-, Ovarial-, Prostata-Karzinomen und im HCC (García-Fernández et al. 2003, Schulz et al. 2004). Reubi und Waser untersuchten eine Vielzahl von Tumorgeweben vergleichend auf eine Expression des VPAC-1- und des VPAC-2-Rezeptors hin. Dabei wiesen nahezu alle Ileum-Karzinome (26 von 27), alle Glukagonome (3 von 3), alle VIPome (4 von 4), die meisten Bronchial-Karzinome (26 von 28), eine hohe Anzahl von Insulinomen (26 von 27) und etwa 50 % der untersuchten Gastrinome (6 von 10) den VPAC-1-, jedoch keines der Präparate den VPAC-2-Rezeptor auf (Reubi und Waser 2003).

Der **PAC-1-Rezeptor** ist hauptsächlich in neuronalen und endokrinen Tumoren zu finden, unter anderem in Gliomen, Meningiomen, Neuroblastomen, GH-produzierenden Hypophysenadenomen, Phäochromozytomen, aber auch in Endometrium-, Brust- sowie Prostata-Karzinomen und seltener in Insulinomen, Karzinoiden, Ovarial- und kolorektalen Adeno-Karzinomen (Dickson und Finlayson 2009, Harmar et al. 2012, Schulz et al. 2004).

## 2.4 VIP- und PACAP-Analoga

Da die Rezeptoren von VIP und PACAP – VPAC-1, VPAC-2, und PAC-1 – in einer Vielzahl von Tumorzellen überexprimiert werden (Ortner et al. 2010), wurde VIP bereits 1994 erstmals als Zielmolekül zur direkten Tumorsuche vorgestellt (Bhargava et al. 2002). Auch aufgrund der bronchodilatatorischen und atemwegsprotektiven Eigenschaften von VIP und PACAP wurden synthetische Analoga zur potentiellen Asthma-Behandlung entwickelt (Vaudry et al. 2009). Weitere potentielle Therapiemöglichkeiten werden für VIP in der Behandlung sexueller Impotenz, von Schlaganfällen, des septischen Schockes sowie chronischer und neuronaler Inflammation gesehen (Couvineau und Laburthe 2012b). Hauptproblem des natürlich vorkommenden VIP in vivo ist jedoch, dass es eine sehr kurze Halbwertszeit aufweist, da es schnell enzymatisch durch die Neutrale Endopeptidase, die Mastzell-Chymase und die Mastzell-Tryptase abgebaut wird, weswegen metabolisch stabile Analoga gebraucht werden (Groneberg et al. 2006, Igarashi et al. 2005, Ortner et al. 2010). Als stark selektive Agonisten für den VPAC-1-Rezeptor sind [Ala<sup>11,22,28</sup>]VIP und das VIP/GRF-Hybrid [Lys<sup>15</sup>,Arg<sup>16</sup>,Leu<sup>27</sup>]VIP(1–7)/GRF(8–27)-NH<sub>2</sub> bekannt. PG 97–269 ist wiederum ein hochselektiver VPAC-1-Rezeptor-Antagonist (Harmar et al. 2012).

Ein hochselektiver Agonist für den VPAC-2-Rezeptor wurde mit Ro 25-1553 gefunden. Ro 25-1553 ist ein 31 Aminosäuren langes Analogon von VIP. Wie VIP wirkt auch sein Analogon bronchodilatatorisch, ist jedoch viel potenter und metabolisch stabiler als das natürlich vorkommende Peptid. Zu den weiteren Vorteilen dieser Verbindung gehört, dass sie die Allergen-induzierte Bronchokonstriktion und die Einwanderung eosinophiler Granulozyten hemmt. Im Vergleich mit dem  $\beta_2$ -Sympathomimetikum Formoterol zeigte sich, dass Ro 25-1553 zwar 3-7-mal geringer potent als der etablierte Bronchodilatator war, jedoch in der Efficacy und der Wirkungsdauer gleich gute Ergebnisse lieferte und somit eine gute Alternative für  $\beta_2$ -Sympathomimetika darstellen könnte (Källström und Waldeck 2001). Sowohl bei Ro 25-1553 als auch bei Formoterol zeigten sich keine klinisch relevanten Nebenwirkungen (Lindén et al. 2003). Neben dem zyklischen Ro 25-1553 existiert noch das zyklische Ro 25-1392 als sehr selektiver VPAC-2-Rezeptor-Agonist (Juarranz et al. 1999). Hochselektive VPAC-2-Rezeptor-Antagonisten konnten bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht entwickelt werden. Einzig das Analogon PG99-465 ist ein starker VPAC-2-Rezeptor-Antagonist, jedoch auch ein partieller Agonist an diesem Rezeptor sowie ein voller VPAC-1- und PAC-1-Rezeptor-Agonist (Harmar et al. 2012, Juarranz et al. 1999).

Der am stärksten selektive PAC-1-Rezeptor-Agonist und somit ein PACAP-Analogon ist Maxadilan, ein Peptid, welches aus der Speicheldrüse von Sandfliegen isoliert wurde und keinerlei Sequenz-Homologie zu VIP oder PACAP aufweist. Maxadilan  $\Sigma 24-42$  und Maxadilan  $\Sigma 25-41$  sind synthetische Varianten von Maxadilan und sehr selektive Antagonisten des PAC-1-Rezeptors (Harmar et al. 2012).

## **2.5 Antikörper**

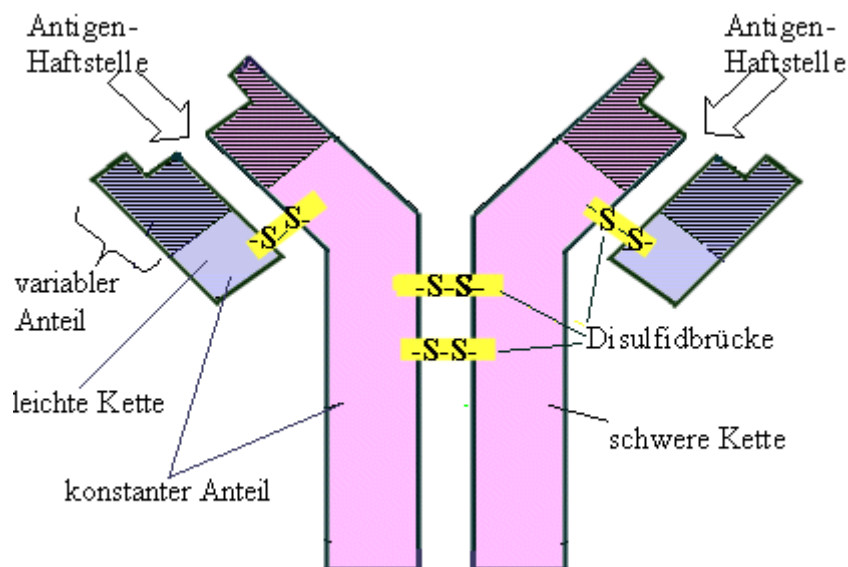
Antikörper (Immunglobuline, Ig) sind ein wichtiger Bestandteil der adaptiven spezifischen Immunantwort der Wirbeltiere und werden von ausdifferenzierten B-Lymphozyten, den Plasmazellen, gebildet. Nach einer Aktivierungskaskade durch T-Helferzellen bilden Plasmazellen je nach Stadium und Ort der Immunantwort fünf verschiedene Isotypen von Antikörpern, dazu gehören IgG, IgM, IgD, IgA und IgE (Rassow et al. 2008). Wesentliche Aufgabe aller Immunglobuline ist es, Pathogene oder ihre toxischen Produkte in den Extrazellularräumen zu binden und somit zu markieren, sodass sie von Phagozyten oder dem Komplement-System zerstört werden können.

Zum allgemeinen Aufbau aller Antikörper gehören stets vier gepaarte schwere („heavy“ oder H-Ketten) und leichte („light“ oder L-Ketten) Polypeptidketten. Zur Verdeutlichung des

Aufbaus soll dieser nochmals am häufigsten Immunglobulin, dem IgG, erläutert werden (Abb. 6).

Ein IgG-Molekül besteht aus zwei H- und L-Ketten. Die zwei H-Ketten sind untereinander und mit jeweils einer L-Kette über Disulfidbrücken verbunden. Die leichten Ketten lassen sich in Lambda- und Kappa-Ketten unterteilen, wobei ein Antikörper nur Lambda- oder nur Kappa-Ketten besitzt. Im Gegensatz dazu bestimmt die Struktur der schweren Kette die Effektorfunktion und den Isotyp eines Antikörpers.

Weiterhin wird der obere Anteil des „Y“, der den Aminoterminus und die Antigenbindungsstelle darstellt, als variable oder V-Domäne bezeichnet und, je nachdem, ob zur H- oder L-Kette gehörig, wird dieser Abschnitt  $V_H$ - oder  $V_L$ -Domäne genannt. Demgegenüber ist der untere Anteil des „Y“, der Carboxyterminus, die konstante oder C-Domäne. Auch hier wird zwischen einer  $C_H$ - und  $C_L$ -Domäne unterschieden (Murphy et al. 2009).



**Abb. 6:** Schematische Darstellung eines Immunglobulin-G-Moleküls. Ein IgG besteht aus zwei schweren (rot dargestellt) und zwei leichten (blau dargestellt) Ketten. Die schweren Ketten sind untereinander und mit den leichten Ketten über Disulfidbrücken verknüpft. Schraffiert dargestellt sind die variablen Domänen, an denen sich die Antigenbindungsstellen befinden. Der restliche Teil des Antikörpers wird als konstante Domäne bezeichnet und bestimmt den Isotyp des Immunglobulins (<http://www.scheffel.org.bw.schule.de/faecher/science/biologie/immunologie/3immunantwort/immunit.htm>).

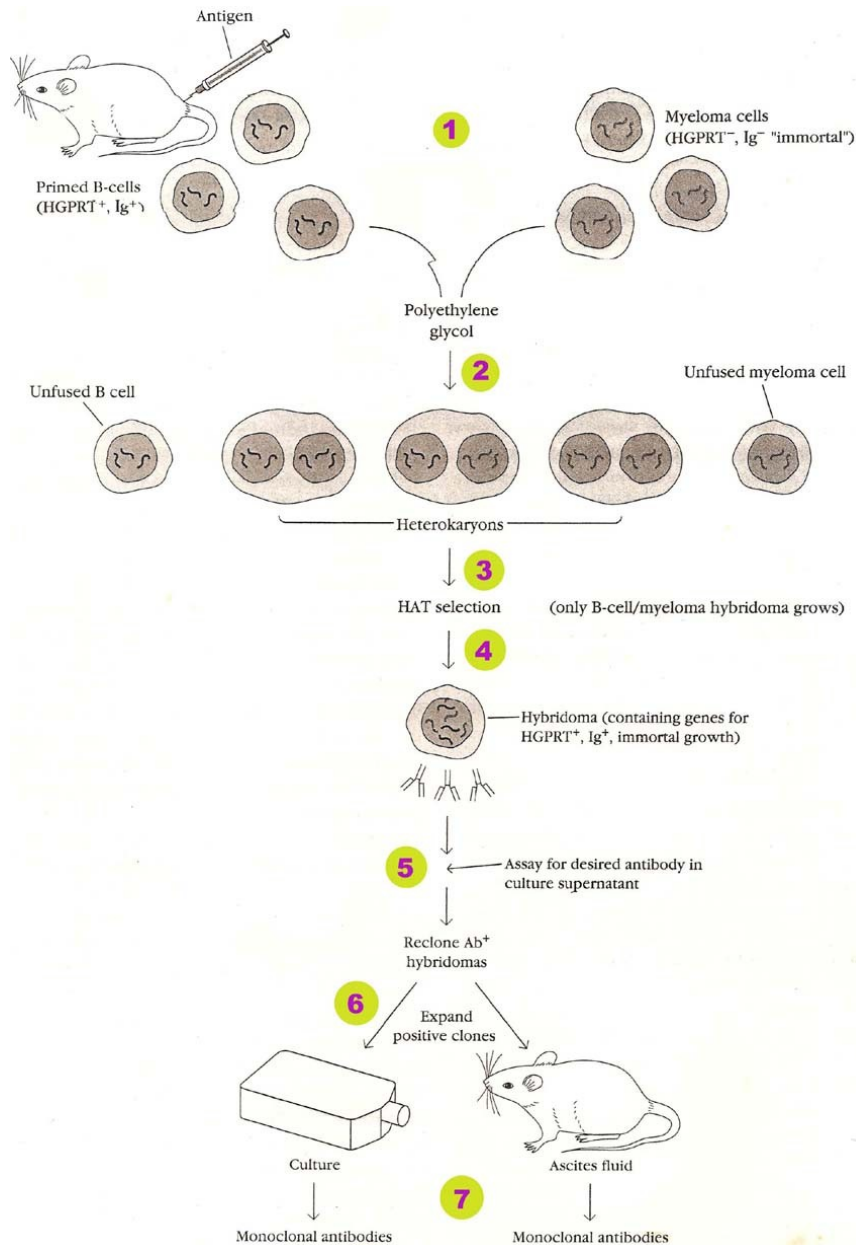
Zur diagnostischen oder therapeutischen Nutzung von Antikörpern müssen polyklonale von monoklonalen abgegrenzt werden. Immunglobuline, die von unterschiedlichen B-Lymphozytenklonen abstammen, nennt man polyklonal. Meist ist es nicht ratsam, diese Antikörper für diagnostische und therapeutische Zwecke zu nutzen, da die nach Immunisierung eines Spenderorganismus so gebildeten Antikörpergemische stets unterschiedliche Spezifitäten zu einer Vielzahl von Antigenen besitzen.

Dahingegen besitzen monoklonale Antikörper den entscheidenden Vorteil, dass sie nur von einem einzigen B-Lymphozyten-Klon produziert werden und somit eine konkrete Spezifität gegen ein einzelnes Antigen aufweisen (Dübel et al. 2004). Aufgrund dessen sind monoklonale Antikörper polyklonalen zu Forschungs-, Diagnose- und Therapie Zwecken vorzuziehen.

### **2.5.1 Herstellung monoklonaler Antikörper**

Die Herstellung monoklonaler Antikörper mittels Hybridom-Technik wurde 1975 erstmals von George Köhler und César Milstein beschrieben (Köhler und Milstein 1975).

Bei diesem Verfahren (Abb. 7) werden zunächst Mäuse oder Ratten mit dem Antigen immunisiert, gegen welches man monoklonale Antikörper produzieren möchte. Dies wird solange wiederholt, bis ausreichend hohe Antikörper-Titer bestehen. Anschließend wird die Milz aus dem Versuchstier entfernt und die Milzzellen isoliert (Scriba und Pforte 2000). Um die eigentlich sterblichen Milzzellen zu immortalisieren, fusioniert man diese mittels Polyethylenglykol (PEG) mit unsterblichen Myelomzellen, sodass so genannte B-Zellmyelomhybridome entstehen (Scriba und Pforte 2000, Vollmar et al. 2013). Die ausgewählten Myelomzellen haben die Besonderheit, dass sie selbst keine Antikörper produzieren und ihnen das Enzym Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) fehlt, wohingegen normale Milzzellen diesen Enzymdefekt nicht aufweisen (Scriba und Pforte 2000). Nach Hinzugabe eines HAT-Mediums (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) sterben somit die nicht fusionierten Myelomzellen ab; nicht fusionierte Milzzellen sind dahingegen nicht lange lebensfähig, sodass einzig B-Zellmyelomhybridome überleben. Mittels Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assays (ELISA) werden die Zellen auf eine Produktion der gesuchten Antikörper hin gescreent und anschließend die Hybridome, die den gesuchten Antikörper produzieren, isoliert und geklont. Diese stehen dann für die Antikörper-Produktion zur Verfügung (Vollmar et al. 2013).



**Abb. 7:** Schematische Darstellung der Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Das Versuchstier wird mit dem Antigen immunisiert, gegen welches die HGPRT-positiven B-Lymphozyten Antikörper bilden. Zudem werden unsterbliche, HGPRT-negative Myelomzellen vorbereitet, denen Antikörper fehlen (1). Plasmazellen und Myelomzellen fusionieren in PEG (2). Ein HAT-Medium, in dem unfusionierte Plasmazellen nach ihrer begrenzten Lebensdauer sterben und unfusionierte Myelomzellen aufgrund ihres Enzymdefektes nicht überleben, wird hinzugegeben (3). Es verbleiben unsterbliche, HGPRT-positiv, antikörperbildende Hybridome (4). Mittels ELISA werden die gesuchten Hybridome auf die Produktion des gewünschten Antikörpers hin gescreent (5) und die Antikörper-positiven Hybridome anschließend geklont und weiter vermehrt (6). So ist ein fortwährender Zugriff auf neue monoklonale Antikörper mit der gleichen Spezifität gesichert (7) (<http://biosiva.50webs.org/mab.htm>).

### **2.5.2 In dieser Arbeit verwendete monoklonale Antikörper**

Die in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Kaninchen-Antikörper 141H4L2 und 83H1L2 sind monoklonaler Herkunft und wurden im Auftrag des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena von SPRING Bioscience (Pleasanton, Kalifornien, USA) hergestellt.

Der monoklonale Kaninchen-Anti-Mensch-Antikörper 141H4L2 ist gegen den VPAC-1-Rezeptor gerichtet und erkennt die carboxyterminale Aminosäuresequenz der Aminosäuren 390 bis 416 (STQVSMLTRVSPGARRSSSFQAEVSLV). Das Antigen des monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-Antikörpers 83H1L2 ist der VPAC-2-Rezeptor. Hierbei wird die carboxyterminale Aminosäuresequenz der Aminosäuren 412 bis 438 detektiert (RNGSESALQFHRGSRAQSFLQTETSVI).

### **3 Zielsetzung**

Die Rezeptoren von VIP und PACAP – VPAC-1, VPAC-2 und PAC-1 – werden von zahlreichen Tumoren überexprimiert, sodass sie ein bedeutendes Target in der Tumordiagnostik und -therapie darstellen könnten (Bhargava et al. 2002, Couvineau und Laburthe 2012b, Ortner et al. 2010, Schulz et al. 2004). Hierfür ist jedoch eine exakte Aufschlüsselung des Expressionsmusters der jeweiligen Rezeptoren im entarteten Gewebe eine notwendige Voraussetzung (Reubi et al. 2002).

Für die immunhistochemische Detektion der VPAC-Rezeptor-Familie standen jedoch bisher nur sehr wenige spezifische polyklonale und keine spezifischen monoklonalen Antikörper zur Verfügung (Schulz et al. 2004, Schulz et al. 2014). Ein klarer Vorteil der monoklonalen gegenüber den polyklonalen Antikörpern ist jedoch, dass sie eine konkrete Spezifität gegen ein einzelnes Antigen besitzen und praktisch in uneingeschränkter Menge in immer derselben Qualität erzeugt werden können. Im Gegensatz dazu können polyklonale Antikörper mehrere Spezifitäten enthalten und somit in ihrer Güte stark variieren (Dübel et al. 2004, Vollmar et al. 2013). Aufgrund dieses bestehenden Problems wurden die monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-1- (141H4L2) und -VPAC-2- (83H1L2) Antikörper hergestellt. Sie sind gegen die Carboxy-terminale Sequenz des humanen VPAC-1- bzw. des humanen VPAC-2-Rezeptors gerichtet, die jeweils große Ähnlichkeiten mit den entsprechenden Sequenzen der Maus und der Ratte aufweist. Somit wurde bei den Untersuchungen mit Kreuzreaktionen der beiden Antikörper zwischen den drei Spezies gerechnet.

Das Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Charakterisierung der beiden monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-1- bzw. -VPAC-2-Antikörper. Dabei sollte die Spezifität mittels immunzytochemischer Untersuchungen an stabil mit den entsprechenden Rezeptoren transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen an Zellen und normalen Mausgeweben, immunhistochemischer Färbungen an normalen Human- und Rattengeweben sowie an humanen Tumorgeweben und Peptidneutralisationen untersucht werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Lösungen und Standardpuffer

##### 4.1.1.1 Immunzytochemie

DMEM (G418) (Basismedium mit 4,5 g/l Glucose)

1 % L-Glutamin

10 % FCS

1 % Penicillin / Streptomycin

0,4 g/l Geneticindisulfatlösung (G418).

Geneticindisulfat-(G418)-Stammlösung

400 µg Geneticin pro ml steriles H<sub>2</sub>O.

Phosphat-Puffer 0,1 M, pH 7,4

13,7 g Dinatriumhydrogenphosphat

3,2 g Natriumdihydrogenphosphat

0,1 % Triton X-100

auf 1000 ml mit aqua bidest. auffüllen.

Poly-L-Lysin-Stammlösung

1 mg Poly-L-Lysin

in 1 ml aqua bidest.

Trypsin-Lösung:

0,05 % Trypsin

0,02 % EDTA

auf 100 ml mit PBS auffüllen.

Zamboni-Fixierlösung

350 ml gesättigte Pikrinsäure

80 g Paraformaldehyd

auf 2 l mit Phosphatpuffer auffüllen.



#### 4.1.1.2 Western-Blot

##### Blotpuffer (1x)

3,03 g Tris

11,25 g Glycin

100 ml 10 % Methanol

mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

##### Elektrophoresepuffer (10x)

30,3 g Tris

144 g Glycin

10 g SDS

mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

##### Luminol

55 µl 90 mM p-Cumarsäure (14,77 g/l in DMSO) und

125 µl 250 mM Luminol (44,3 g/l in DMSO)

in 12,5 ml 100 mM Tris (pH 8,3) zugeben.

10 µl Perhydrol (konzentrierte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung) in weitere 12,5 ml Tris hineingeben.

Beide Tris-Lösungen vermischen.

##### RIPA-Puffer

8,8 g Natriumchlorid

6,0 g Tris

0,9 g EDTA

10 ml 1 % Igepal (Nonidet P-40)

5,0 g Na-Desoxycholat

5 ml SDS

mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Natriumchlorid, EDTA und Tris ansetzen und den pH auf 7,4 einstellen. Anschließend restliche Inhaltsstoffe hinzufügen.

Dem fertigen Puffer jeweils vor Gebrauch noch Protease-Inhibitoren („Complete mini“) und Phosphorylierungshemmer („Phospho-Stop“) zufügen.

### Sammelgelpuffer

2 g SDS

30,28 g Tris

mit aqua bidest. auf 500 ml auffüllen.

### Sammelgel 4 %

1 ml 30 % Acrylamid

4,7 ml aqua bidest.

1,8 ml Sammelgelpuffer

9 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED)

24 µl 10 % Ammoniumpersulfat (APS).

### SDS-Probenpuffer pH 7,6

4,925 g Tris-HCl

10 g Natriumdodecylsulfat (SDS)

100 ml Glycerol

15,4 mg/ml Dithiothreitol kurz vor Benutzung zugeben.

0,005 % Bromphenolblau

für 500 ml.

### TBS (10x)

500 ml Tris-HCl

87 g Natriumchlorid

mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

pH 7,6 mit Natronlauge einstellen.

### TBS-T

200 ml 10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

2 ml Tween 20

mit aqua bidest. auf 1800 ml auffüllen.

TPBS pH 7,4 (15x)

18,16 g Tris  
7,5 g Thiomersal  
135 g Natriumchlorid  
in 700 ml Phosphatpuffer lösen.  
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Trenngelpuffer

4 g SDS  
181,72 g Tris  
mit aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Trenngel 8 %

4,24 ml 30 % Acrylamid  
7,76 ml aqua bidest.  
4 ml Trenngelpuffer  
20 µl TEMED  
80 µl 10 % APS.

**4.1.1.3 Immunhistochemie**

Ammoniakwasser

1,4 ml 25 %iger Ammoniak  
auf 250 ml aqua bidest.

Avidin-Biotin-Komplex

100 µl Reagenz A (Avidin)  
100 µl Reagenz B (biotinylierte Peroxidase)  
in 5 ml PBS/RSA  
(Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA).

Citrat-Puffer-Stammlösung A (0,1 M)

21,01 g Zitronensäure  
in 1000 ml aqua bidest. lösen.

Citrat-Puffer-Stammlösung B (0,1 M)

29,41 g Natriumcitrat  
in 1000 ml aqua bidest. lösen.

Citrat-Puffer (0,01 M) pH 6,0

36 ml Stammlösung A  
164 ml Stammlösung B  
1800 ml aqua bidest.  
pH-Einstellung mittels 2 N Natronlauge.

Mowiol

6 g Glycerin  
2,4 g Mowiol 4-88  
6 ml aqua bidest.  
12 ml Tris-HCl (0,2 M; pH 8,5)  
25 mg/ml Lösung DABCO.

PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,4

1,77 g/l Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat  
0,2 g/l Kaliumchlorid  
0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat  
8,18 g/l Natriumchlorid  
in 1000 ml aqua bidest.

Substratchromogen

2,5 ml 5x H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Puffer  
5 Tropfen 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (AEC)  
in 10 ml aqua bidest.  
(BioGenex, Fremont, Kalifornien, USA).

## 4.1.2 Verwendete Antikörper, Zelllinien, Laborgeräte, Verbrauchsmaterialien und Substanzen

### 4.1.2.1 Antikörper

#### 141H4L2

monoklonaler Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-1-Antikörper

C-terminale Sequenz des Antigens beim Mensch: STQVSMLTRVSPGARRSSSFQAEVSLV

C-terminale Sequenz des Antigens bei der Maus: STQVSMLTRVSPSARRSSSFQAEVSLV

C-terminale Sequenz des Antigens bei der Ratte: STQVSMLTRVSPSARRSSSFQAEVSLV

SPRING Bioscience, Pleasanton, Kalifornien, USA

Da die Sequenz des humanen VPAC-1-Rezeptors denen der Maus und der Ratte sehr ähnelt, sind Kreuzreaktionen zu erwarten. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind rot markiert.

#### 83H1L2

monoklonaler Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-2-Antikörper

C-terminale Sequenz des Antigens beim Mensch: RNGSESALQFHRGSRAQSFLQTETSVI

C-terminale Sequenz des Antigens bei der Maus: RNGSESALQIHRGSRTQSFLQSETSVI

C-terminale Sequenz des Antigens bei der Ratte: RNGSESALQIHRGSRTQSFLQSETSVI

SPRING Bioscience, Pleasanton, Kalifornien, USA

Da die Sequenz des humanen VPAC-2-Rezeptors denen der Maus und der Ratte sehr ähnelt, sind Kreuzreaktionen zu erwarten. Die unterschiedlichen Aminosäuren sind rot markiert.

#### Sekundär-AK für die Immunzytochemie

Alexa-488-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper

IgG (H+L), 2 mg/ml

Invitrogen, Oregon, USA

#### Sekundär-AK für die Western-Blot-Analysen

Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper

Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Kalifornien, USA

### Sekundär-AK für die Immunhistochemie

biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper

Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA

#### **4.1.2.2 Zelllinien**

HEK-293: humane embryonale Nierenzelllinie (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland)

HEK-293-VPAC-1: stabil mit dem humanen VPAC-1-Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen

HEK-293-VPAC-2: stabil mit dem humanen VPAC-2-Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen

#### **4.1.2.3 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien**

- Blotkammer Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell Bio-Rad, München, Deutschland
- Blot-Papier Bio-Rad, München, Deutschland
- Brutschrank HERAccl<sup>®</sup> 240 Heraeus, Hanau, Deutschland
- CO<sub>2</sub> Inkubator Heracell 150i Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Deckgläser Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
- Entwicklungsmaschine AGFA Curix 60 Agfa-Gevaert AG, Morstel, Belgien
- Eppendorf-Gefäße Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
- Filmkassette Amersham Hypercassette<sup>™</sup> Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
- Fuji SuperRX Safelight Glass 13x18 (medizinischer Röntgenfilm) Fujifilm Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
- Handschuhe Ansell, München, Deutschland
- Laboklav SHP Steriltechnik, Magdeburg, Deutschland
- Laborwaage Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Leica Jung-Histokinette 2000 Leica, Solms, Deutschland
- LSM 510 META Laser-Scanning-Mikroskop Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Magnetrührer Schott Instruments GmbH, Mainz,

- Mikroskop Axio Imager A1  
Deutschland  
Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Mikroskop Motic<sup>®</sup> AE20  
Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
- Mikrowelle CB 1271  
Bomann, Kempen, Deutschland
- Milli Q Advantage A10  
Millipore, Billerica, Massachusetts,  
USA
- Multiwell Kulturplatte  
Becton Dickinson Labware, Franklin  
Lakes, New Jersey, USA
- Neubauer-Zählkammer  
Superior, Marienfeld, Deutschland
- Objektträger SuperFrost<sup>®</sup> Plus  
Menzel-Gläser, Braunschweig,  
Deutschland
- Olympus-DP-70-Kamera-System  
Olympus America Inc., Center  
Valley, Pennsylvania, USA
- Paraffin-Gieß-Automat EG 1110  
Leica, Solms, Deutschland
- Pasteurpipetten  
Hecht Assistent, Sondheim,  
Deutschland
- Petrischalen Cellstar<sup>®</sup>  
Greiner Bio-One, Frickenhausen,  
Deutschland
- pH-Labormessgerät pH 211  
Hanna Instruments, Kehl,  
Deutschland
- Pipetten 0,5-10 µl / 10-100 µl / 100-1000 µl /  
1-5 ml  
Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Pipettenspitzen PP 0,5-10 µl / 10-100 µl /  
100-1000 µl / 1-5 ml  
Carl Roth GmbH, Karlsruhe,  
Deutschland
- PP-Test-Tubes 15 ml / 50 ml  
Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Proteingelkammer Mini-PROTEAN<sup>®</sup> Tetra  
Cell  
Bio-Rad Laboratories, München,  
Deutschland
- Rotationsmikrotom HM 335 E  
Microm, Walldorf, Deutschland
- SafeSeal Reagiergefäße 0,5 ml / 1,5 ml / 2 ml  
Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- Schüttelgerät Unimax 1010  
Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Schüttelwasserbad SW27  
Julabo, Seelbach, Deutschland
- Sequenza<sup>®</sup>-Färbesystem  
Thermo Fisher Scientific, Waltham,  
Massachusetts, USA

- Serological Pipette 5 ml / 10 ml / 25 ml Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Sterilbank Hera Safe Thermo Fisher Scientific, Langenselbold, Deutschland
- Sterilium® Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
- Thermomixer compact Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Ultraschall-Homogenisator Sonifier 450 Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
- Ultraschallstab Branson, Schwäbisch Gmünd, Deutschland
- Vortexer REAX 2000 Heidolph, Schwabach, Deutschland
- Wasserbad Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
- Zellkulturflaschen 75 cm<sup>2</sup>, 250 ml SPL Life Sciences, Pocheon-si, Südkorea
- Zellkulturplatten 24 Well Greiner, Frickenhausen, Deutschland
- Zentrifuge 5417 C Eppendorf, Hamburg Deutschland
- Zentrifuge Biofuge 28RS Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

#### 4.1.2.4 Substanzen für die Immunzytochemie

- DePeX SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- DMEM High Glucose (4,5 g/l) PAA, Pasching, Österreich
- Dulbecco's PBS PAA, Pasching, Österreich
- Fluoromount-G SouthernBiotech, Birmingham, England
- G418-Sulfat-Lösung (50 mg/ml), Geneticin® PAA, Pasching, Österreich
- L-Glutamin (200 mM) PAA, Pasching, Österreich
- Lipofectamin 2000® Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
- Natriumhydrogenphosphat- PAA, Pasching, Österreich



- Monohydrat
- NGS (normales Ziegen Serum) PAA, Pasching, Österreich
  - PACAP Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
  - Paraformaldehyd Riedel-de-Haën, Seelze, Deutschland
  - PBS PAA, Pasching, Österreich
  - Penicillin/Streptomycin-Lösung PAA, Pasching, Österreich
  - Pikrinsäure Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
  - Poly-L-Lysin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
  - Thiomersal AppliChem, Darmstadt, Deutschland
  - Triton<sup>®</sup> X-100 Ferak Berlin, Berlin, Deutschland
  - Trypsin-EDTA 0,05 % / 0,02 % in PBS PAA, Pasching, Österreich

#### 4.1.2.5 Substanzen für die Western-Blot-Analysen

- Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung 30 % Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ammoniumpersulfat AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Bromphenolblau Bio-Rad, München, Deutschland
- Complete-mini<sup>®</sup> EDTA-free Roche, Mannheim, Deutschland
- Dithiotreitol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- EDTA Roche, Mannheim, Deutschland
- Glycin Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Igepal Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Luminol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Molekulargewichtsmarker (Prestained PageRuler) Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
- Natrium-Desoxycholat Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- p-Cumarsäure Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Pepstatin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- PhosSTOP<sup>®</sup> Roche, Mannheim, Deutschland
- Rinderserumalbumin (RSA) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

- Roti<sup>®</sup>-PVDF-Membran Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- SDS-Lösung 20 % Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- TEMED Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- TRIS-Hydrochlorid Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Tween<sup>®</sup>20 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Wasserstoffperoxid 30 % Merck, Darmstadt, Deutschland
- WGA-Beads - Lectin, immobilisiert auf Agarose CL-4B von Triticum vulgare Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

#### 4.1.2.6 Substanzen für die Immunhistochemie

- AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol) BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA
- Ammoniak Merck, Darmstadt, Deutschland
- Citrat-Puffer-Bestandteile Merck, Darmstadt, Deutschland
- DABCO Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Ethanol Merck, Darmstadt, Deutschland
- Glycerin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Mayer's Hämatoxylin Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- Methanol Merck, Darmstadt, Deutschland
- Mowiol 4-88 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- PBS-Puffersalze Merck, Darmstadt, Deutschland
- Rinderserumalbumin (RSA) Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
- TRIS Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Kit Vector Laboratories Inc., Burlingame, Kalifornien, USA
- Xylol Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Immunzytochemie

Zunächst wurden die monoklonalen Antikörper 141H4L2 für den VPAC-1 und 83H1L2 für den VPAC-2 mittels Immunzytochemie charakterisiert. Ziel war es, festzustellen, ob die Antikörper spezifisch den jeweiligen Rezeptor (VPAC-1 bzw. VPAC-2) erkennen. Auch wurde mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen des Agonisten PACAP ( $25 \cdot 10^{-9}$  M und

$25 \cdot 10^{-7}$  M) über jeweils unterschiedliche Zeiten (15 und 30 min) das Internalisierungsverhalten der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren VPAC-1 und VPAC-2 untersucht.

Für diese Versuche dienten humane embryonale Nierenzellen (HEK-293), die stabil mit den entsprechenden Rezeptoren transfiziert worden waren. Weiterhin wurde überprüft, ob eine Kreuzreaktivität der beiden Antikörper mit dem jeweils anderen Rezeptor besteht.

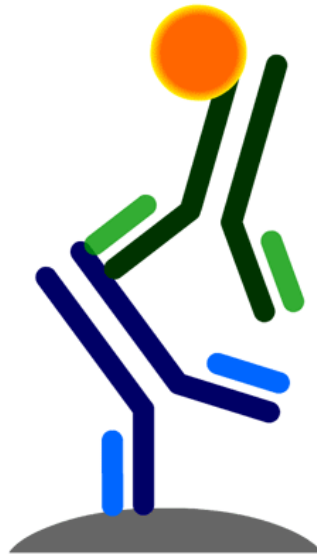
#### **4.2.1.1 Durchführung**

Am ersten Tag wurden die stabil den VPAC-1 bzw. VPAC-2 exprimierenden HEK-293-Zellen auf eine 24-Well-Zellkulturplatte zu etwa 150.000 Zellen je Well aufgetragen. Die 24 Wells wurden zuvor mit Poly-L-Lysin-Lösung beschichteten Deckgläschen versehen, sodass eine Anheftung der Zellen auf diesen möglich war. Das Poly-L-Lysin wurde hierzu in einer Verdünnung von 1:10 auf die Deckgläschen gegeben und diese dann mit dem Poly-L-Lysin für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 3-mal mit aqua bidest. gewaschen und die Deckgläschen über eine Stunde getrocknet. Die Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 – 90 % aus einer Zellkulturflasche mit 5 ml DMEM(+) und Trypsin zu etwa 150.000 Zellen auf die Deckgläser ausgesät und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> wachsen gelassen. Durch das Trypsin wurden die bestehenden Zell-Zell-Verbindungen gelöst. Dies verhinderte ein Verklumpen bzw. Zusammenwachsen auf einem Haufen und begünstigte ein breitflächiges Wachstum der Zellen.

Am folgenden Tag wurden die Zellen mit PACAP in den Konzentrationen von  $25 \cdot 10^{-9}$  M (1 µl PACAP) bis  $25 \cdot 10^{-7}$  M (100 µl PACAP) für 0 min, 15 min und 30 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> stimuliert und nach dreimaligem Spülen mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) anschließend mit ZAMBONI-Fixierlösung fixiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Lösung entfernt, indem die 24 Wells mehrmals mit PBS-Puffer gewaschen wurden. Daraufhin wurden die Zellen mit PBS-Puffer + 3 % NGS (Normal Goat Serum = Normales Ziegen Serum) für 2 h inkubiert. Mittels Methanol wurde die Permeabilisierung der Zellwand und Blockierung unspezifischer Ladungen ermöglicht. Nach drei Spülgängen mit PBS wurden die Primärantikörper in PBS + 3 % NGS (Verdünnung 1:5000 und 1:2500) gegen jeweils den VPAC-1 bzw. den VPAC-2 über Nacht bei Raumtemperatur hinzugegeben. Hierbei wurde in jedes Well 300 µl des entsprechenden Primärantikörpers gegeben.

Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde am nächsten Tag der Fluoreszenz-Farbstoffgekoppelte Sekundärantikörper (Alexa-488-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper)

in einer Verdünnung von 1:750 hinzugegeben (Abb. 8). Der ungebundene Anteil wurde nach einer Inkubationszeit von 2 h, wiederum durch mehrmaliges Spülen mit PBS, abgewaschen. Die Deckgläschen mit den Zellen wurden schließlich auf Objektträger mit Fluoromount-G eingebettet.



**Abb. 8:** Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz. Der antigenspezifische Primärantikörper (blau), in dieser Arbeit der Anti-VPAC-1- bzw. Anti-VPAC-2-Antikörper, bindet sein Antigen (grau), den VPAC-1- bzw. VPAC-2-Rezeptor. An den Primärantikörper koppelt der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper (grün) artspezifisch, in diesem Fall der Alexa-488-gekoppelte Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper. Die so gegebene Fluoreszenz ermöglicht es, über den Sekundär- den Primärantikörper und somit die Lokalisation des gesuchten Antigens aufzufinden ([http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3\\_fluoreszenz/fluorochrome/4c\\_indirekteIF.htm](http://www.univie.ac.at/mikroskopie/3_fluoreszenz/fluorochrome/4c_indirekteIF.htm)).

#### **4.2.2 Rezeptoranreicherung aus Zellen und Geweben, SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und Western-Blot-Analysen**

Ziel der Rezeptoranreicherung, SDS-PAGE und Western-Blot-Analysen war es, die monoklonalen VPAC-1- und VPAC-2-Antikörper weiter zu charakterisieren.

Hierbei dienten für die Immunpräzipitation der Rezeptoren aus Geweben Organe von Wildtypmäusen vom Typ C57BL/6, welche am Vortag entnommen und zur Aufbewahrung in Eppendorfgläsern mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert wurden.

Die Rezeptoranreicherung aus den humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293), die stabil mit den Rezeptoren VPAC-1 bzw. VPAC-2 transfiziert worden waren, unterlag bis zur SDS-

Page einer gesonderten Bearbeitung, verlief ab diesem Arbeitsschritt aber wie die Präzipitation der Rezeptoren aus den Gewebeproben.

#### **4.2.2.1 Rezeptoranreicherung aus HEK-293-Zellen**

Die mit dem VPAC-1 bzw. mit dem VPAC-2 stabil transfizierten HEK-293-Zellen wurden in 60-mm-Poly-L-Lysin beschichteten Platten (Verdünnung 1:1000) bis zu einer Konfluenz von 80 % wachsen gelassen und anschließend mit eiskaltem PBS abgewaschen. Zuvor hergestellter und mit Inhibitoren versetzter RIPA-Puffer wurde hinzugegeben und die Platten wurden für 10 min zum Inkubieren auf Eis gelegt. Die Zellen konnten daraufhin mit einem Zellschaber von den Platten abgetrennt werden und in 1 ml große Gefäße überführt werden, um erneut für 10 min auf Eis zu inkubieren.

Während die Lysate für 30 min bei 4 °C und 14000 U/min zentrifugiert wurden, wurden 30 µl WGA-Beads in 1,5 ml große Gefäße pipettiert, diese einmal mit 1 ml RIPA-Puffer ohne Inhibitoren gewaschen und für eine ausreichende Pelletierung anzentrifugiert. Die Überstände der Lysate wurden zu den WGA-Beads gegeben und mussten für 2 h auf dem Rotationsschüttler im Kühlraum inkubieren.

Nach der Inkubationszeit wurde dreimal mit 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen und der Ansatz in der Kühlzentrifuge anzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, 80 µl SDS-Probenpuffer (DTT) hinzugegeben und für 25 min bei 43 °C inkubiert. Nachdem nochmals für 5 min abzentrifugiert worden war, konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. Nun wurde so verfahren, wie in den Kapiteln „SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese“, „Western-Blot“ und „Antikörperbehandlung und Nachweis der Proteine“ beschrieben.

#### **4.2.2.2 Aufbereitung der Gewebe**

Die Gewebeproben in den Gefäßen wurden zur besseren Haltbarkeit, insbesondere zur Verhinderung autolytischer Prozesse, in einem Eisbad mit RIPA-Puffer und Inhibitoren (bestehend aus dem Protease-Inhibitor „Complete mini“ und dem Phosphorylierungs-Inhibitor „PhosSTOP“) zur Verwendung aufgetaut und aufbewahrt.

Die Gewebe mussten als nächstes zerkleinert werden. Jene, die viel Muskel- und Bindegewebe enthalten (Magen, Dünndarm, Dickdarm, Herz, Milz), wurden zunächst unter flüssigem Stickstoff mit dem Mörser und dem Skalpell zerkleinert. Danach wurden diese und die restlichen Gewebe (Hoden, Leber, Niere und Nebenniere, Hirn, Pankreas) mittels eines Ultraschallstabes endgültig homogenisiert und nach Zugabe von 1 ml RIPA-Puffer mit Inhibitoren für 2 h bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert.

#### **4.2.2.3 Isolierung der Rezeptoren mittels WGA-Beads**

Während der Inkubationszeit wurden die Weizenkeimlecithin-Agarose-Kügelchen (WGA-Beads) vorbereitet, indem mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze 40 µl auf 1 ml RIPA-Puffer in einem separaten Gefäß angesetzt und dieser Ansatz gevortext wurde. Daraufhin wurde etwa 1 ml des Gemisches in neue Eppendorfgefäße verteilt und diese für 2 min bei 3500 U/min zentrifugiert.

Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Proben für 30 min bei 4 °C und 14800 U/min zentrifugiert, sodass der Überstand, mit der Pipette aufgenommen, auf die vorher vorbereiteten WGA-Beads aufgebracht werden konnte. So war gewährleistet, dass die Rezeptoren durch Bindung an die WGA-Beads isoliert werden konnten.

Nach erneuter zweistündiger Inkubationsdauer bei 4 °C und darauf folgender Zentrifugation wurden die Proben mit je 1 ml RIPA-Puffer gewaschen. Daraufhin wurde dreimal zentrifugiert und die Überstände jedes Mal mittels einer Insulinspritze abgesaugt, bis die Gefäße frei von Überstand waren. Die Zugabe von 80 µl SDS+DTT je Gefäß ermöglichte es, die Rezeptoren von den WGA-Beads zu lösen. Durch eine 25-minütige Inkubation bei 48 °C mit 850 U/min auf dem Schüttler und anschließendem Zentrifugieren gelang es, die Rezeptoren von den WGA-Beads, die nun auf dem Grund waren, abzutrennen und in den Überstand zu bringen.

#### **4.2.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese**

Die im Überstand in Lösung vorliegenden VPAC-1- und VPAC-2-Rezeptoren sowie weitere glykosylierte Proteine wurden für die sich anschließende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) verwendet. Ziel dieses Verfahrens ist die Auftrennung der Proteine nach deren Größe. Hierbei hat das Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) eine entscheidende Rolle: es maskiert zum einen die Eigenladungen der Proteine, da es stark negativ geladen ist, sodass alle gebundenen Proteine eine negative Ladung aufweisen. Desweiteren denaturiert es bei hohen Temperaturen die Proteine, womit die Größe der Proteine das ausschlaggebende Kriterium für die Wanderungsgeschwindigkeit bei der nachfolgenden Elektrophorese darstellt. Es geschieht eine Trennung nach Molekulargewicht: kleine Proteine wandern schneller und weiter als größere.

Für die elektrophoretische Auftrennung wurden ein 4 %iges Sammelgel und ein 8 %iges Trenngel verwendet. Um die Bandenhöhe zu detektieren, wurden in die erste Tasche des Sammelgels 3 µl Marker gegeben, in die weiteren Taschen jeweils 20 µl des zuvor gewonnenen Überstandes; es wurde jeweils für den VPAC-1- und den VPAC-2-Rezeptor eine

separate Elektrophorese durchgeführt. Daraufhin wurde die Spannung angelegt: zunächst 90 V für 10 min, bis die Lauffront innerhalb des Sammelgels an die Grenze zum Trenngel kam, gefolgt von 130 V für 1 h, bis die blaue Lauffront das Trenngel durchlaufen hatte.

#### **4.2.2.5 Western-Blot**

Nach Entnahme der zwei Gele wurden die Sammelgele abgetrennt und verworfen. Die Trenngele und das Blot-Papier wurden so lange in Blotpuffer inkubiert, bis eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) in 100 %igem Methanol aktiviert war. Daraufhin wurde in die Transferzelle der Blotkammer auf die Anode ein Blot-Papier gelegt, gefolgt von der aktivierten PVDF-Membran, dem Gel und abschließend einer weiteren Schicht Blot-Papier. An die Kathode wurden 500 mA für 15 min angelegt; so entstand auf der PVDF-Membran, die für den weiteren Verlauf weiterverwendet wurde, eine exakte Kopie des Gels mit den aufgetrennten Proteinen.

#### **4.2.2.6 Antikörperbehandlung und Nachweis der Proteine**

Die PVDF-Membran wurde aus der Blotkammer entnommen und für 45 min bei 140 U/min auf einem Schüttler in RSA inkubiert, um unspezifische Bindungen im weiteren Verlauf zu verhindern. In der Zwischenzeit wurden zwei Schalen vorbereitet: in die eine wurden zu 10 ml RSA 2 µl des monoklonalen Anti-VPAC-1-Antikörpers 141H4L2 und in die andere, ebenfalls 1:5000 verdünnt, der monoklonale Anti-VPAC-2-Antikörper 83H1L2 pipettiert. In diesen Schalen inkubierten die jeweiligen Membranen über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C.

Am folgenden Tag wurden die Membranen dreimal für jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen, sodass der Sekundärantikörper, ein Meerrettich-peroxidase-gekoppelter Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper, 1:5000 verdünnt, hinzugegeben werden konnte. Nach 2-stündiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-T gewaschen.

Zwischenzeitlich wurde ein p-Cumarsäure-Luminol-Gemisch angesetzt, indem in 12,5 ml 0,1 M Tris (pH 8,3) Luminol und p-Cumarsäure gegeben wurde, in weitere 12,5 ml Tris 15 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, um beides daraufhin zusammenzuführen. In diesem Gemisch inkubierten die Membranen für einige Minuten und wurden anschließend in Filmkassetten eingespannt. In der Dunkelkammer wurde in die Kassetten noch ein Chemilumineszenz-sensitiver Röntgenfilm eingelegt. Durch die Peroxidase des Sekundärantikörpers, der entsprechend nur an den Stellen vorhanden war, in denen auch der Primärantikörper den Rezeptor gebunden hatte, wurde das

Luminol oxidiert, wodurch Licht als freigewordene Energie entstand. Dadurch wurde, gemäß der Stärke und Position der Bande, der Röntgenfilm belichtet. Abschließend wurden die Filme in einer Entwicklermaschine entwickelt. Um unterschiedliche Detektionszeiten (1 min, 5 min, 15 min) zu erhalten, beließ man die Röntgenfilme für mehrere Zeitspannen in der Filmkassette.

#### **4.2.2.7 Peptidneutralisation**

Die Peptidneutralisation hatte den Zweck, einen zusätzlichen Spezifitätsnachweis des Anti-VPAC-1- und des Anti-VPAC-2-Antikörpers zu erbringen. Bei diesem Verfahren wurden die Antikörper (Verdünnung jeweils 1:5000 in PBS/RSA) für 2 h mit 10 µg/ml des jeweiligen Peptids, welches für die Immunisierung der Kaninchen und somit für die Herstellung der Antikörper verwendet worden war, bei Raumtemperatur inkubiert. Bei gegebener Spezifität der Antikörper führt dies zur vollständigen Auslöschung des Immunsignals.

Hierfür wurden folgende Organe von Wildtypmäusen vom Typ C57BL/6 verwendet: Hirn, Herz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Pankreas, Niere, Nebenniere, Hoden und Milz. Anstatt der Antikörper wurde jedoch nun das Antikörper-Peptid-Gemisch auf die PVDF-Membranen gegeben.

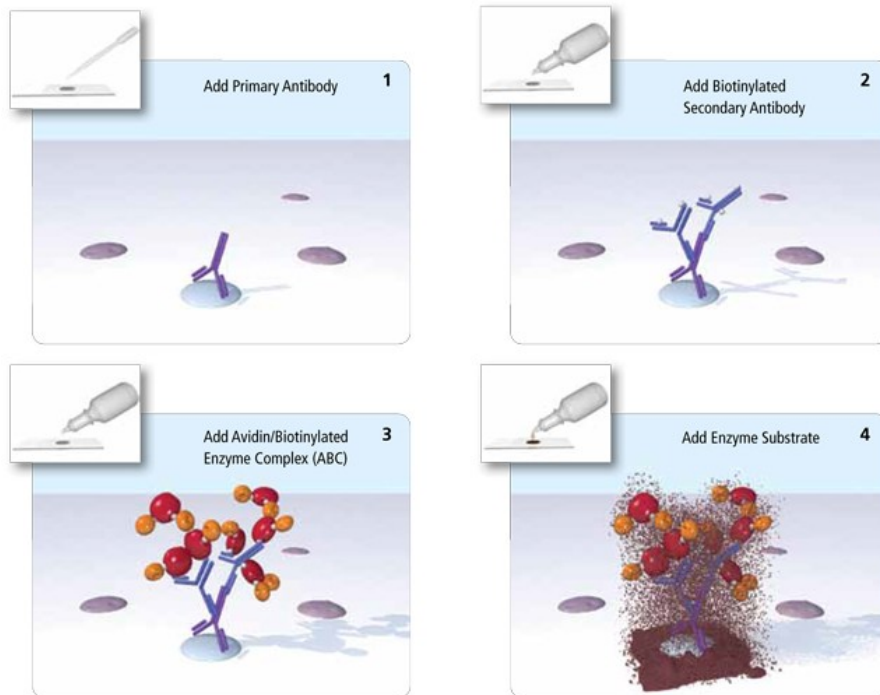
#### **4.2.3 Immunhistochemie**

Der VPAC-1 und der VPAC-2 wurden in den vorliegenden Gewebeschnitten mit Hilfe der Avidin-Biotin-Komplex-Methode, die auch indirekte Peroxidase-Reaktion genannt wird, immunhistochemisch nachgewiesen (Abb. 9).

Hierfür wurden als Primärantikörper, je in einer Verdünnung von 1:5000, der monoklonale Kaninchen-Anti-VPAC-1-Antikörper 141H4L2 und der monoklonale Kaninchen-Anti-VPAC-2-Antikörper 83H1L2 verwendet, um die jeweils gesuchten Rezeptoren aufzufinden. Als Sekundärantikörper diente ein Ziegen-Anti-Kaninchen-Antikörper in einer Verdünnung von 1:67, der zum einen den Primärantikörper artspezifisch bindet und zum anderen an Biotin kovalent gekoppelt ist. Aufgrund dessen, dass der Sekundärantikörper biotinyliert ist, konnte hinzugegebenes Peroxidase-gekoppeltes Avidin, 1:34 verdünnt, an diesen binden. Die daran konjugierte Peroxidase zersetzte  $H_2O_2$  unter Sauerstofffreisetzung. Die Präparate wurden anschließend mit dem Substratchromogen AEC versetzt, welches von dem Sauerstoff umgesetzt wurde. Dadurch gab es einen Farbumschlag; die zu erkennende Rot-Braunfärbung war schließlich ein indirekter Indikator für die Lokalisation der gesuchten Rezeptoren.



Zwischen den einzelnen Schritten wurden die Schnitte mit PBS/1 % RSA gewaschen, um nicht oder unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen.



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode. Zunächst wird der antigenspezifische Primärantikörper hinzugegeben (1). Dieser wird vom artspezifischen biotinylierten Sekundärantikörper gebunden (2), an den aufgrund des Biotins hinzugefügtes Avidin koppelt, welches wiederum mit einer Meerrettich-Peroxidase verknüpft ist (3). Durch die Umsetzung eines dazugegebenen Enzymsubstrates ist ein rot-brauner Farbumschlag zu erkennen (4) (<http://www.vectorlabs.com/products.asp?catID=42&locID=0>).

#### 4.2.3.1 Durchführung

Die genaue Durchführung der immunhistochemischen Färbung der Präparate geschah nach dem folgenden Protokoll (Tabelle 1):

**Tabelle 1:** Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Paraffinschnitten.

Arbeitsschritte	Lösungen	Mengen [µl]	Inkubationszeit [min]
1. Für die nachfolgenden Schritte werden alle Präparate in Glas-Färbeküvetten einsortiert.			
2. Entparaffinieren	Xylol		20
	Xylol		20
	Xylol		20

3. Xylol entfernen	100 % Ethanol	20
	100 % Ethanol	20
	100 % Ethanol	20
4. Blockierung der endogenen Peroxidase, um unspezifische Färbungen zu verhindern	3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in Methanol	45
5. Rehydrierung der Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe	95 % Ethanol	2
	95 % Ethanol	2
	80 % Ethanol	2
	70 % Ethanol	2
	aqua bidest.	5
	aqua bidest.	5
6. Für den nachfolgenden Schritt werden alle Objektträger aus den Glas-Färbeküvetten in Citrat-Puffer-gefüllte Plastikkuvetten umsortiert.		
7. Demaskierung der Antigene zur Verstärkung der Signalintensität	im Citrat-Puffer (0,01 M, pH 6,0) in der Mikrowelle bei 600 W	
	Kochen	8
	Abkühlen	4
	Kochen	4
	Abkühlen	4
	Kochen	4
8. Im Anschluss müssen die Präparate für etwa 30 Minuten auf handwarm abkühlen und werden dann in den Körben der Plastikkuvetten für mindestens 5 Minuten in aqua bidest. gestellt.		
9. pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes, um unspezifische Bindungen zu verhindern	PBS mit 1 % RSA	5

<b>10.</b> Für die weiteren Schritte werden die Objektträger in Sequenza <sup>®</sup> -Färbesysteme einsortiert. Bei diesem System entsteht nach Einbringen der Präparate ein kapillärer Spalt, über welchen die weiteren Lösungen zugegeben werden.				
<b>11.</b> pH-Pufferung, Absättigung der unterschiedlichen Ladungen innerhalb des Gewebes	PBS mit 1 % RSA	1500		
<b>12.</b> Blockierung unspezifischer Bindungen, um Hintergrundfärbungen zu vermeiden	normales Ziegen-Serum (entspricht der Spezies des Sekundär-AK)	150	20	
<b>13.</b> Bindung des Antikörpers (AK)	Kaninchen-Anti-VPAC-1-AK 141H4L2 / Kaninchen-Anti-VPAC-2-AK 83H1L2	300		bei 4 °C über Nacht ( im Kühlraum)
<b>14.</b> Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500		
	PBS mit 1 % RSA	1500		
<b>15.</b> Zugabe des Sekundär-AK	Biotinylierter Ziegen-Anti-Kaninchen-AK	150	30	
<b>16.</b> Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene AK zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500		
<b>17.</b> Zugabe des enzymgekoppelten Komplexes, um die Farbreaktion zu ermöglichen	Avidin-Peroxidase-Komplex	150	30	
<b>18.</b> Waschen der Schnitte, um nicht oder unspezifisch gebundene Komplexe zu entfernen	PBS mit 1 % RSA	1500		
<b>19.</b> Färben der AK-gebundenen Bereiche durch Zugabe des	AEC	150	15	
	AEC	150	15	

Substratchromogens		
20. Waschen und damit Stoppen der Reaktion	aqua bidest.	1500
21. Für die weitere Bearbeitung werden die Präparate aus dem Färbesystem in die Glas-Färbeküvetten zurücksortiert.		
22. Waschen	aqua bidest.	1
	aqua bidest.	1
23. Gegenfärbung der Zellkerne	Mayer's Hämatoxilin	50 sek
24. Waschen	aqua bidest.	2,5
25. Hämatoxylin-Bläuung	Ammoniakwasser	5x Eintauchen
26. Waschen	aqua bidest.	2,5
27. Im Anschluss daran werden die Präparate mit Mowiol und Deckgläsern eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet.		

#### 4.2.3.2 Peptidneutralisation

Zur weiteren Spezifitätsbestimmung der untersuchten Antikörper wurden auch hier zusätzliche immunhistochemische Färbungen an ausgewählten positiven Präparaten mit einem Peptid-Antikörper-Gemisch durchgeführt.

Die Antikörper wurden jeweils für 2 h bei Raumtemperatur mit 10 µg/ml des Peptids, welches zur Immunisierung der Kaninchen und Herstellung der Antikörper verwendet worden war, inkubiert. Die einzelnen Schritte der Färbung sind der Tabelle 1 zu entnehmen, mit dem Unterschied, dass im 13. Schritt das Antikörper-Peptid-Gemisch anstelle des Antikörpers verwendet wurde.

#### 4.2.3.3 Präparate

Für die durchgeführten immunhistochemischen Versuche wurden sowohl menschliche Tumorgewebe und menschliche Nicht-Tumorgewebe als auch Rattenorgane verwendet, die in Formalin fixiert und in Paraffinblöcken eingebettet worden waren. Das menschliche Material wurde aus den Archiven der Institute für Pathologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald und dem Zentralklinikum Bad Berka zur Verfügung gestellt. Die Rattenorgane stammten (mit Ausnahme von Uterus und Ovar) von männlichen 60 – 90 Tage alten HAN:Wistar-Auszucht-Ratten aus der ehemaligen Rattenzucht des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Jena. Die Organe waren in

Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet und für eine spätere Verwendung archiviert worden. Aus den bereitgestellten Blöcken wurden mittels eines Mikrotoms 4 µm dicke Schnitte gewonnen, die anschließend auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Verwendung gelagert wurden.

Zu den untersuchten Rattenorganen gehörten für den **VPAC-1-Rezeptor**: Hirn (n = 6), Hypophyse (n = 2), Auge (n = 6), Rückenmark (n = 9), Ganglien (n = 4), Tränendrüse (n = 6), Parotis (n = 6), Speicheldrüse (n = 6), Herz (n = 5), Lunge (n = 6), Magen (n = 5), Duodenum (n = 6), Leber (n = 6), Pankreas (n = 6), Nebenniere (n = 4), Niere (n = 6), Hoden (n = 5), Nebenhoden (n = 5), Samenblase (n = 6), Uterus (n = 1), Ovar (n = 4), Lymphknoten (n = 3), Milz (n = 6) und Thymus (n = 6).

Zum Nachweis des **VPAC-2-Rezeptors** dienten folgende Rattenorgane: Hirn (n = 5), Hypophyse (n = 1), Auge (n = 6), Rückenmark (n = 5), Ganglien (n = 4), Tränendrüse (n = 6), Parotis (n = 6), Speicheldrüse (n = 6), Herz (n = 6), Lunge (n = 6), Magen (n = 6), Duodenum (n = 6), Leber (n = 6), Pankreas (n = 6), Nebenniere (n = 4), Niere (n = 6), Hoden (n = 6), Uterus (n = 4), Lymphknoten (n = 3), Milz (n = 3) und Thymus (n = 5).

Folgende menschliche Tumorpräparate standen zur Untersuchung des **VPAC-1** zur Verfügung: Glioblastom (n = 1), Hypophysenadenom (n = 25), Schilddrüsen-Karzinom (n = 2), mikronoduläres Thymom (n = 6), Lungentumor (n = 13; davon kleinzelliges Bronchial-Karzinom [n = 5]; Adeno-Karzinom [n = 5]; Plattenepithel-Karzinom [n = 3]), Tumore des Magen-Darm-Traktes (n = 30; davon gastrointestinaler Stromatumor [n = 4]; Magen-Antrum-Karzinom [n = 4]; Magen-Korpus-Karzinom [n = 13]; diffuses Magen-Karzinom [n = 4]; Magen-Karzinom vom intestinalen Typ [n = 5]), Pankreas-Karzinom (n = 11; davon Pankreas-Karzinom-Primärtumor [n = 10]; Pankreas-Karzinom-Lebermetastase [n = 1]), Phäochromozytom (n = 3), Neuroendokriner Tumor (n = 66), Sarkom (n = 19; davon Leiomyosarkom [n = 4]; Rhabdomyosarkom [n = 3]; pleomorphes Sarkom [n = 2]; Liposarkom [n = 4]; Angiosarkom [n = 2]; Osteosarkom [n = 4]), Hämangiom (n = 3), Prostata-Karzinom (n = 9), Harnblasen-Karzinom (n = 7), Mamma-Karzinom (n = 3), Ovarial-Karzinom (n = 14), Endometriose (n = 1) und Cervix-Karzinom (n = 4).

Zum selben Zwecke wurden angrenzendes Normalgewebe der Tumore sowie nachstehende normale Gewebeproben verwendet: Cortex (n = 3), Hypophyse (n = 4), Rückenmark (n = 3), Spinalganglion (n = 3), Schilddrüse (n = 1), Herz (n = 3), Gewebe des Magen-Darm-Traktes (n = 28; davon Duodenum [n = 6]; Jejunum [n = 3]; Ileum [n = 1]; Colon ascendens [n = 3]; Colon transversum [n = 1]; Colon descendens [n = 2]; Colon sigmoideum [n = 6]; Rektum [n

= 6]), Leber (n = 10), Gallenblase (n = 5), Pankreas (n = 7), Niere (n = 2), Mamma (n = 1), Cervix (n = 4), Corpus uteri (n = 1), Prostata (n = 15), Lymphknoten (n = 16), Milz (n = 15) und Tonsille (n = 15).

Nachfolgende Tumorpräparate wurden auf den **VPAC-2** hin untersucht: Glioblastom (n = 2), Hypophysenadenom (n = 25), Schilddrüsen-Karzinom (n = 2), mikronoduläres Thymom (n = 6), Lungentumor (n = 12; davon kleinzelliges Bronchial-Karzinom [n = 5]; Adeno-Karzinom [n = 5]; Plattenepithel-Karzinom [n = 2]), Tumore des Magen-Darm-Trakts (n = 31; davon gastrointestinaler Stromatumor [n = 4]; Magen-Antrum-Karzinom [n = 5]; Magen-Korpus-Karzinom [n = 14]; diffuses Magen-Karzinom [n = 3]; Magen-Karzinom vom intestinalen Typ [n = 5]), Pankreas-Karzinom (n = 10; davon Pankreas-Karzinom-Primärtumor [n = 9]; Pankreas-Karzinom-Lebermetastase [n = 1]), Phäochromozytom (n = 5), Neuroendokriner Tumor (n = 30), Sarkom (n = 19; davon Leiomyosarkom [n = 4]; Rhabdomyosarkom [n = 3]; pleomorphes Sarkom [n = 2]; Liposarkom [n = 4]; Angiosarkom [n = 2]; Osteosarkom [n = 4]), Hämangiom (n = 2), Prostata-Karzinom (n = 8), Harnblasen-Karzinom (n = 7), Mamma-Karzinom (n = 8), Ovarial-Karzinom (n = 12), Endometriose (n = 1) und Cervix-Karzinom (n = 9).

Gleichfalls wurde im angrenzenden Normalgewebe der Tumore sowie in folgenden nicht pathologisch veränderten Gewebeproben nach dem Rezeptor gesucht: Cortex (n = 2), Hypophyse (n = 1), Rückenmark (n = 3), Spinalganglion (n = 3), Schilddrüse (n = 1), Herz (n = 3), Gewebe des Magen-Darm-Traktes (n = 19; davon Duodenum [n = 4]; Jejunum [n = 3]; Ileum [n = 2]; Colon ascendens [n = 3]; Colon transversum [n = 1]; Colon sigmoideum [n = 3]; Rektum [n = 3]), Leber (n = 6), Gallenblase (n = 6), Pankreas (n = 5), Niere (n = 3), Mamma (n = 1), Cervix (n = 4), Corpus uteri (n = 1), Prostata (n = 15), Lymphknoten (n = 16), Milz (n = 15) und Tonsille (n = 15).

#### **4.2.3.4 Auswertung**

Für die Auswertung der immunzytochemischen Experimente wurde das konfokale Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 META (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) verwendet.

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Tumor- und Rattengewebeschnitte erfolgte mithilfe eines Lichtmikroskops. Für die semiquantitative Beurteilung aller Schnitte wurde der immunreaktive Score (IRS) nach Remmele und Stegner (Remmele und Stegner 1987) angewandt. Hierbei werden die Färbeintensität und der Prozentsatz positiv gefärbter Zellen betrachtet (siehe Tabelle 2). Durch Multiplikation dieser

beiden Faktoren ergibt sich der IRS, der sich für die immunhistochemischen Färbungen somit von 0 – 12 Punkten erstrecken konnte.

**Tabelle 2:** Immunreaktiver Score (IRS) (nach Remmele und Stegner 1987).

Prozentsatz positiver Zellen	x Färbeintensität	= IRS
keine positiven Zellen: 0 Punkte	keine Färbereaktion: 0 Punkte	0 – 12 Punkte
< 10 % positive Zellen: 1 Punkt	schwache Färbereaktion: 1 Punkt	
10 – 50 % positive Zellen: 2 Punkte	mäßige Färbereaktion: 2 Punkte	
51 – 80 % positive Zellen: 3 Punkte	starke Färbereaktion: 3 Punkte	
> 80 % positive Zellen: 4 Punkte		

## **5 Ergebnisse**

Um die beiden monoklonalen Antikörper für den VPAC-1- bzw. für den VPAC-2-Rezeptor zu charakterisieren, wurden sowohl immunzytochemische und immunhistochemische Färbungen als auch Western-Blot-Analysen durchgeführt. Mit der Fragestellung, wie spezifisch diese zwei monoklonalen Antikörper gegenüber ihren Antigenen (den Rezeptoren VPAC-1 bzw. VPAC-2) sind und wie sich das Expressionsmuster darstellt, wurden sowohl stabil mit dem entsprechenden Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen als auch zahlreiche normalen Ratten- und Humangewebe, aber auch humane Tumorgewebe untersucht.

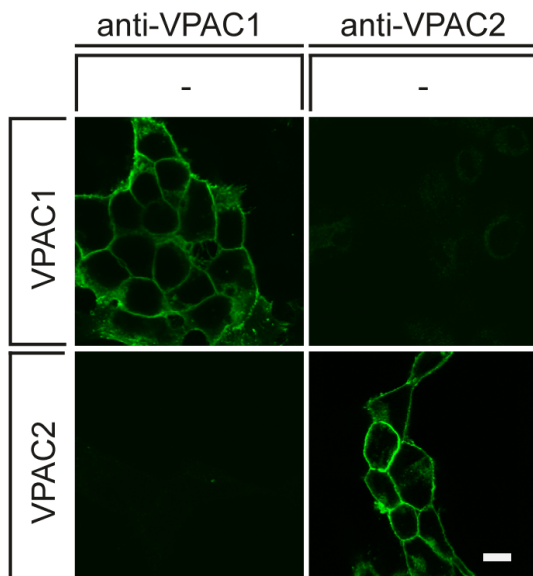
### **5.1 Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen**

Die immunzytochemischen Experimente erfolgten an stabil mit dem humanen VPAC-1 bzw. mit dem humanen VPAC-2 transfizierten HEK-293-Zellen und den jeweiligen Antikörpern für VPAC-1 bzw. VPAC-2 (Verdünnung 1:5000).

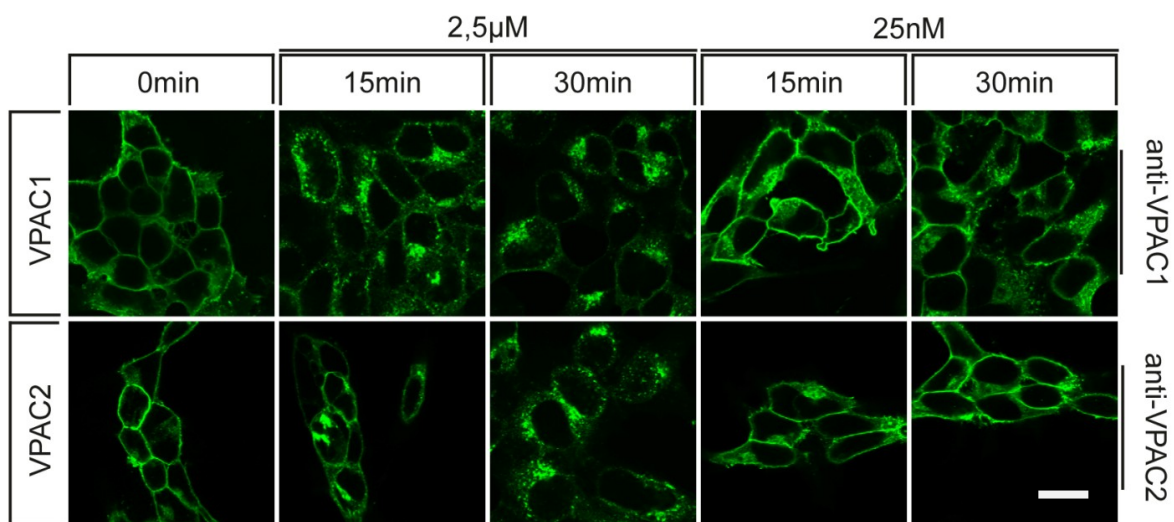
Es war zu beobachten, dass sich die HEK-293-VPAC-1-Zellen nur mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper, nicht aber mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper sichtbar färben ließen (Abb. 10, obere Zeile). Demgegenüber zeigte sich bei den HEK-293-VPAC-2-Zellen ausschließlich ein Immunsignal mit dem Anti-VPAC-2-, jedoch nicht mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper (Abb. 10, untere Zeile). In beiden Fällen ergab sich eine deutliche membranständige Immunfluoreszenz und eine nur geringe intrazelluläre perinukleäre Färbung.

Zusätzlich wurde der zeitliche Verlauf der Rezeptorinternalisierung (0 min, 15 min, 30 min) nach Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen des Agonisten PACAP (25 nM bzw. 2,5  $\mu$ M) beobachtet (Abb. 11). Es konnte festgestellt werden, dass bei 0 min (ohne Ligandenstimulation) die Färbung ausschließlich membranständig war und nicht intrazellulär. Nach Stimulation mit 2,5  $\mu$ M PACAP war bei beiden Zelllinien eine deutliche und mit der Zeit zunehmende intrazelluläre und verminderte membranständige Färbung zu erkennen, entsprechend einer Agonist-induzierten Internalisierung der Rezeptoren. Hingegen blieb die Membranständigkeit der Rezeptoren bei der geringeren PACAP-Konzentration sowohl nach 15 min als auch nach 30 min Stimulation bei beiden Zelllinien größtenteils erhalten.





**Abb. 10:** Immunzytochemie an HEK-293-Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem humanen VPAC-1 (obere Zeile) oder mit dem humanen VPAC-2 (untere Zeile) stabil transfiziert und anschließend mit dem Kaninchen-Anti-VPAC-1-Antikörper (linke Seite) oder mit dem Kaninchen-Anti-VPAC-2-Antikörper (rechte Seite) inkubiert. Der gebundene Primärantikörper wurde anschließend mit Hilfe des Alexa-488-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörpers visualisiert. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 11:** Immunzytochemie an HEK-293-Zellen. An HEK-293-VPAC-1- bzw. HEK-293-VPAC-2-Zellen wurde mittels des Rezeptoragonisten PACAP in den Konzentrationen 25 nM und 2,5  $\mu\text{M}$  eine zeitabhängige (jeweils 15 min und 30 min) Rezeptorinternalisierung gezeigt. HEK-293-VPAC-1-Zellen (obere Zeile) wurden mit dem Kaninchen-Anti-VPAC-1-Antikörper und HEK-293-VPAC-2-Zellen (untere Zeile) mit dem Kaninchen-Anti-VPAC-2-Antikörper sowie anschließend mit einem Alexa-488-gekoppelten Ziegen-Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper inkubiert. Maßstabsbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

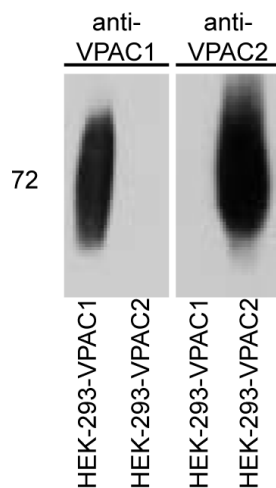
## 5.2 Western-Blot-Analysen

### 5.2.1 Western-Blot-Analysen an HEK-293-Zellen

An stabil transfizierten HEK-293-VPAC-1- und HEK-293-VPAC-2-Zellen wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt, die die Spezifität der Antikörper aufzeigen sollten. Die

gesuchten Rezeptoren wurden mittels WGA-Beads isoliert, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF-Membran geblottet. Nach Hinzugabe der Primär- und Sekundär-Antikörper konnten die so entstandenen Banden mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden.

Es zeigte sich, dass der Anti-VPAC-1-Antikörper (Verdünnung 1:5000) bei den HEK-293-VPAC-1-Zellen zu einer Bande zwischen 50 und 100 kDa, jedoch zu keinem entsprechenden Immunsignal bei den HEK-293-VPAC-2-Zellen führte. Der Anti-VPAC-2-Antikörper (Verdünnung 1:5000) wiederum zeigte nur bei den HEK-293-VPAC-2-Zellen eine breite Bande zwischen 55 und 100 kDa, nicht jedoch bei den HEK-293-VPAC-1-Zellen (Abb. 12).



**Abb. 12:** Western-Blot-Analyse an stabil mit dem humanen VPAC-1 (jeweils linke Spur) bzw. dem humanen VPAC-2 (jeweils rechte Spur) transfizierten HEK-293-Zellen. Marker bei 72 kDa. Mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper fand sich ausschließlich bei den HEK-293-VPAC-1-Zellen (links, zwischen 50 und 100 kDa) ein Signal, wohingegen die mit Anti-VPAC-2-Antikörper behandelten Zellpräparationen ausschließlich Banden bei den HEK-293-VPAC-2-Zellen zeigten (rechts, zwischen 55 und 100 kDa).

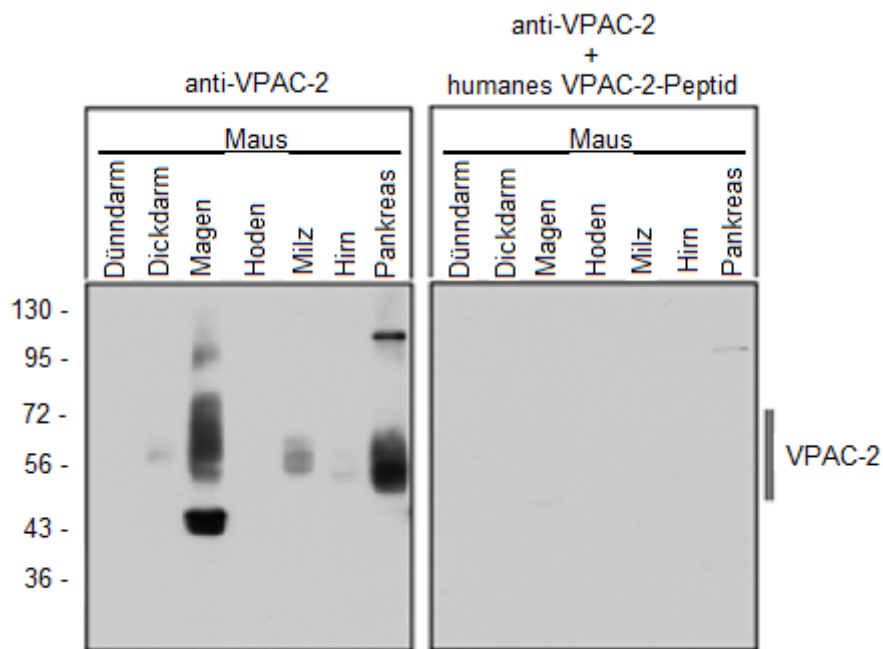
### 5.2.2 Western-Blot-Analysen an normalem Mausgewebe

Zur weiteren Untersuchung der Spezifität des Anti-VPAC-1- und des Anti-VPAC-2-Antikörpers wurden Western-Blot-Analysen an Dünndarm, Dickdarm, Magen, Hoden, Milz, Hirn und Pankreas einer Maus durchgeführt.

Hierbei konnten mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper (jeweils in einer Verdünnung von 1:5000) bei Magen, Pankreas und ansatzweise bei der Milz breite Banden zwischen 50 kDa und 70 kDa beobachtet werden. Der Dickdarm und das Hirn zeigten in dem entsprechenden Bereich nur ein schwaches Signal, wohingegen der Dünndarm und der Hoden keinerlei Immunsignal aufwiesen. Auch gab es unspezifische Banden oberhalb von 70 kDa (bei Magen und Pankreas) bzw. unterhalb von 50 kDa (beim Magen), die Rezeptordimeren bzw. dem unglykosylierten Rezeptor entsprechen könnten (Abb. 13, linker Blot).

Aus Gründen, die im Weiteren noch zu diskutieren sind, zeigten sich beim Anti-VPAC-1-Antikörper bei den Western-Blot-Analysen an normalem Mausgewebe keine spezifischen, sondern nur unspezifische Banden.

Zur zusätzlichen Spezifizierung wurde eine Peptidneutralisation durchgeführt. Hier waren die zuvor mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper detektierten Banden nun nicht mehr sichtbar (Abb. 13, rechter Blot), die durch den Anti-VPAC-1-Antikörper erzeugten unspezifischen Banden blieben jedoch weiterhin bestehen (nicht dargestellt).



**Abb. 13:** Western-Blot-Analysen an normalem Mausgewebe mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper. Der Anti-VPAC-2-Antikörper detektierte ein breites Signal zwischen 50 kDa und 70 kDa bei Magen, Pankreas und, mit schwächerer Intensität, bei Dickdarm, Milz und Hirn (linker Blot). Nach Peptidneutralisation mit dem antigenen Peptid des Anti-VPAC-2-Antikörpers waren die Banden nicht mehr sichtbar (rechter Blot).

### 5.3 Immunhistochemie

Die Anti-VPAC-1- bzw. Anti-VPAC-2-Antikörper wurden in weiteren Schritten immunhistochemisch an normalem Humangewebe, humanem Tumorgewebe und normalem Rattengewebe untersucht. Zur Spezifitätskontrolle wurden zusätzliche Peptidneutralisationen angefertigt.

### 5.3.1 Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Humangeweben

Sowohl mit dem Anti-VPAC-1- als auch mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper wurde eine Vielzahl tumorfreier humaner Gewebe immunhistochemisch gefärbt, um die Verteilung der gesuchten Rezeptoren in Cortex, Hypophyse, Rückenmark, Spinalganglion, Schilddrüse, Herz, Geweben des Magen-Darm-Traktes, Leber, Gallenblase, Pankreas, Niere, Mamma, Cervix, Uterus, Prostata, Lymphknoten, Milz und Tonsille zu untersuchen.

Der **Anti-VPAC-1-Antikörper** detektierte den VPAC-1-Rezeptor hauptsächlich im Magen-Darm-Trakt. Hier war in nahezu allen Präparaten die glatte Muskulatur des Dün- und Dickdarms sehr stark gefärbt. Weiterhin wiesen die Lieberkühn-Darmkrypten des Dünndarms, die Becherzellen, die Dünndarmzotten des Jejunums und vereinzelte Zellen des gastroenteropankreatischen endokrinen Systems eine deutliche Immunfärbung auf.

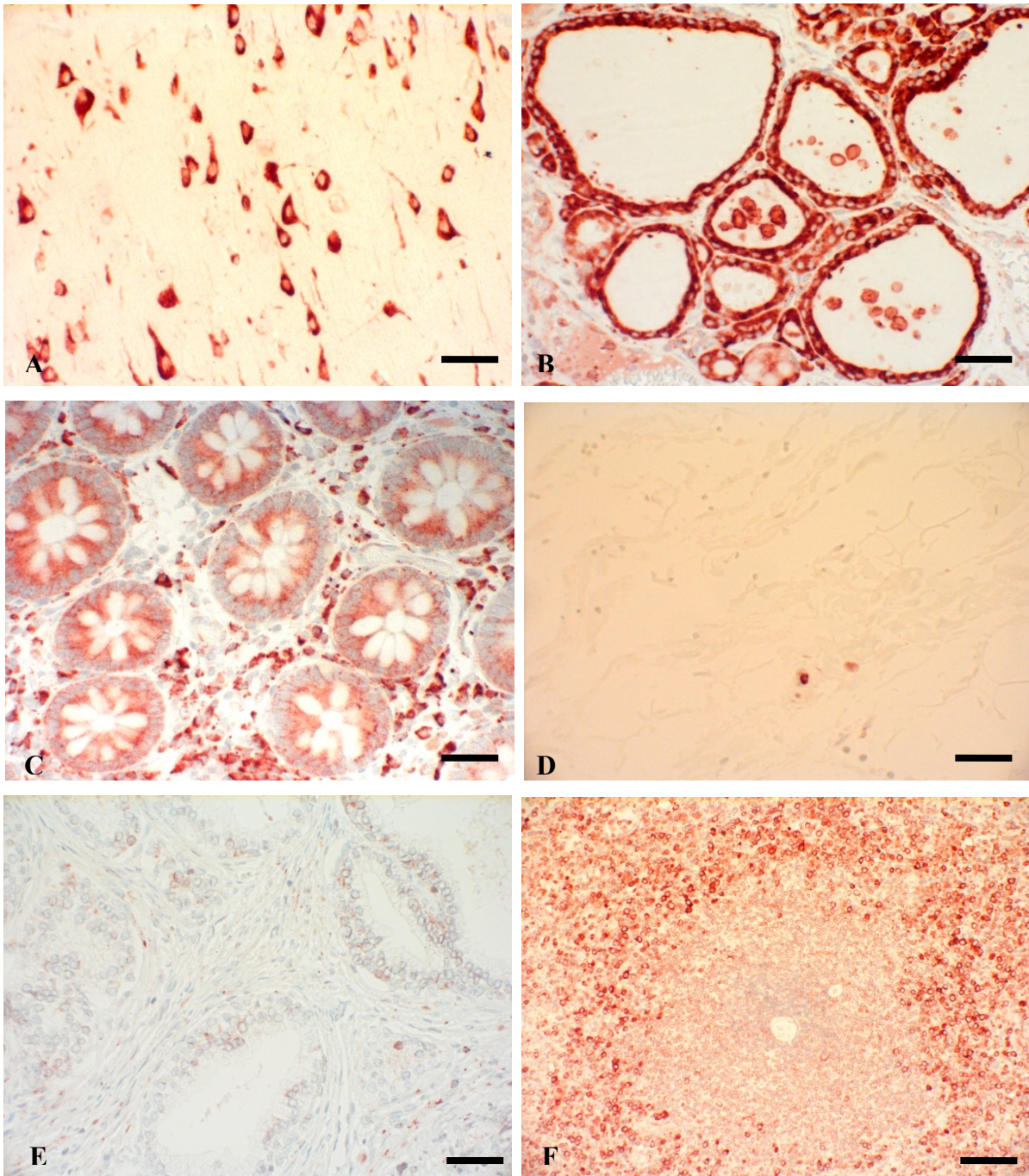
In Präparaten des Cortex waren Pyramidenzellen der Großhirnrinde und Ependymzellen des Ventrikelsystems stark positiv.

Auch die Follikel epithelzellen um das Kolloid der Schilddrüse herum sowie der apikale Anteil der Azinuszellmembranen und die Schaltstücke des Pankreas wiesen meist eine ebenso kräftige, membranständige Färbung auf, wie es im Gastrointestinal-Trakt der Fall war.

Bei den Präparaten des Immunsystems war in der Milz eine meist kräftige Immunfärbung der B-Lymphozyten in der Mantelzone um die Malpighi-Körperchen der weißen Pulpa herum zu beobachten. Weniger stark, aber dennoch spezifisch waren die T-Lymphozyten in der parafollikulären Zone um die Sekundärfollikel der Lymphknoten herum gefärbt. Ebenso sind die Gewebeschnitte der Tonsille zu bewerten, bei denen die T-Lymphozyten des interfollikulären Raumes zu erkennen waren. Mikronodulären Thymompräparaten angrenzendes normales Thymusgewebe zeigte eine nur schwache Immunreaktivität der B-Lymphozyten.

In den Präparaten des Uterus, des Herzens und der Leber waren viele unspezifische Färbungen zu verzeichnen. Dies machte sich darin bemerkbar, dass große Teile der entsprechenden Präparate vollständig gefärbt waren, wie z.B. bei der Leber, oder, dass die vorgefundene Färbung keine Membranständigkeit zeigte. Weitere unspezifische Färbungen, die auch wiederholt in anderen Präparaten zu finden waren, betrafen das Muskelgewebe und verschiedene Zellen, die oft Makrophagen oder Lymphozyten darstellten.

Präparate wie Hypophyse, Rückenmark, Spinalganglien, Gallenblase, Niere, Prostata, Mamma und Zervix wiesen schwache bis keine Färbungen auf (Abb. 14).



**Abb. 14:** Immunhistochemische Färbungen an normalem Humangewebe mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A:** Cortex, **B:** Schilddrüse, **C:** Colon transversum, **D:** Gallenblase, **E:** Prostata, **F:** Milz. Maßstabsbalken: **A = B = C = D = E = 50 µm**, **F = 100 µm**.

Membranständige und spezifische Färbungen des **Anti-VPAC-2-Antikörpers** lieferten zumeist Präparate des Magen-Darm-Trakts. Hier waren Becherzellen aller Darmabschnitte, die Lieberkühn-Darmkrypten des Dünndarmes, sowie das Darmepithel des Ileums stark immungefärbt. Auch einige Zellen des gastroenteropankreatischen endokrinen Systems

wiesen den VPAC-2-Rezeptor auf. Bei den Gewebeschnitten des Darmes ließ sich feststellen, dass, je distaler das Organ liegt, desto schwächer und teilweise unspezifischer wurden die Färbungen.

Weiterhin stellten die proximalen Tubuli der Niere abgrenzbare, größtenteils membranständig und gut gefärbte Strukturen dar.

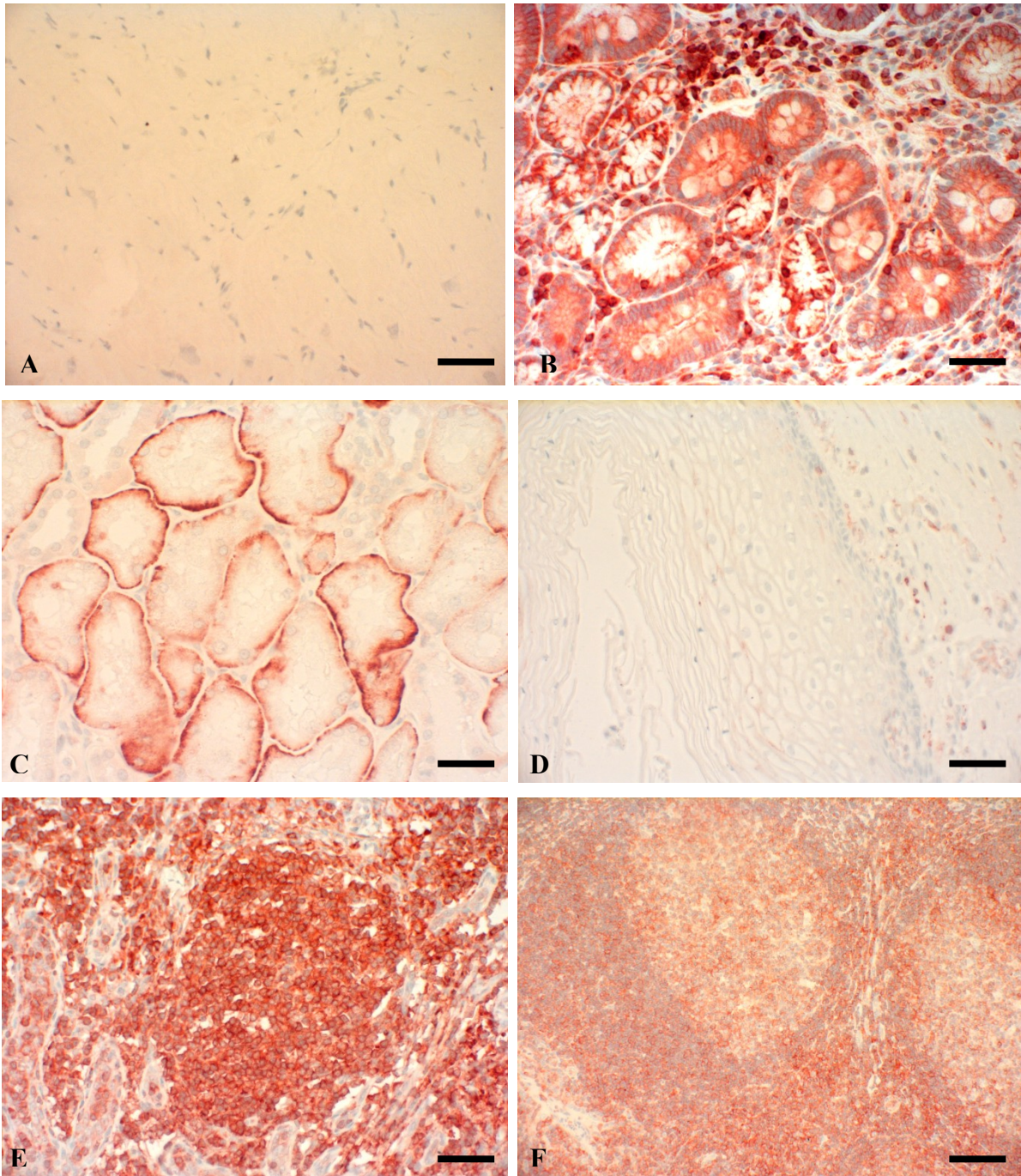
Die Keimzentren der Lymphknoten, die reich an B-Lymphozyten sind, sowie der diese Follikel umgebende Lymphozytenwall mit T-Lymphozyten waren ebenso stark immungefärbt, wie die Tonsille. Bei diesem Gewebe war eine deutliche Immunfärbung der T-Lymphozyten des interfollikulären Raumes sowie der dem Keimzentrum kappenartig aufsitzenden Randwalle mit B-Lymphozyten zu erkennen.

Eine eher schwache, aber dennoch membranständige Immunfärbung ergaben die Präparate der Leber, bei denen Kupffer-Zellen, als organspezifische Makrophagen, deutlich zu erkennen waren. Auch trotz teils unspezifischer Reaktionen ließen sich in den Pankreaspräparaten die apikalen Anteile der exokrinen Azinuszellen als abgrenzbare Strukturen ausmachen, wohingegen der endokrine Pankreasanteil VPAC-2-negativ blieb.

Ebenfalls schwach positiv waren Follikelepithelzellen um das Kolloid der Schilddrüse herum und B-Lymphozyten in den Keimzentren der Milz.

Lediglich unspezifische Immunsignale waren bei Schnitten des Cortex, der Hypophyse, des Rückenmarks, der Spinalganglien und der Gallenblase zu beobachten. Hier waren große Teile des Präparates ohne spezifischen Zellbezug sowie ohne eine Membranständigkeit gefärbt. Auch waren immer Muskulatur, Gefäße oder die an Entzündungsreaktionen beteiligten Lymphozyten positiv, so wie im Falle der Gallenblasenschnitte.

Dagegen waren Gewebeschnitte von Herz, normaler Nebenniere, Mamma, Zervix, Uterus und Prostata komplett negativ (Abb. 15).



**Abb. 15:** Immunhistochemische Färbungen an normalem Humangewebe mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A:** Herz, **B:** Duodenum, **C:** Niere, **D:** Zervix, **E:** Lymphknoten, **F:** Tonsille. Maßstabsbalken: **A = B = C = D = E = 50 µm**, **F = 100 µm**.

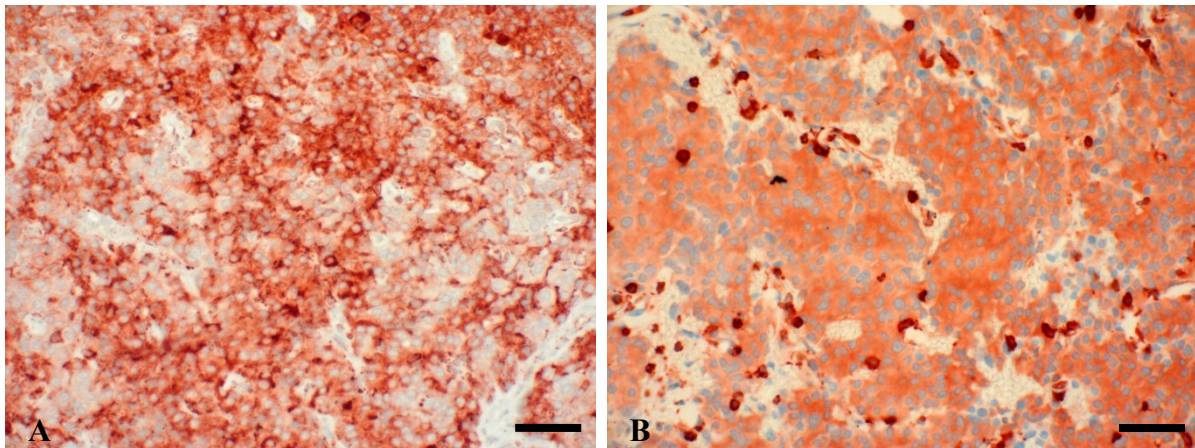
### 5.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben

Neben normalem Humanweebe wurden auch Präparate von Tumorgewebe bzw. pathologischem Gewebe mit dem Ziel angefertigt, die Expression des VPAC-1- bzw. des VPAC-2-Rezeptors zu charakterisieren. Die Schnitte wurden mithilfe des immunreaktiven Scores (IRS) ausgewertet (siehe Tabelle 2).

Bei der Auswertung der Tumorschnitte wurde die Membranständigkeit des Immunsignals berücksichtigt. Zudem wurde darauf geachtet, ob im Bezug zur Intensität der Färbung und dem Prozentsatz positiver Zellen eine interindividuelle Variabilität innerhalb der jeweiligen Entität besteht, was sich dann in den Minimal- und Maximalwerten des IRS widerspiegelt.

Bei dem vorhandenen **Glioblastom**-Schnitt konnte keine Immunfärbung mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper nachgewiesen werden und auch die vorhandene Positivität, die mit Hilfe des Anti-VPAC-2-Antikörpers erzielt wurde, war mit einem IRS von 1 als eher vernachlässigbar gering einzustufen.

In den untersuchten **Hypophysenadenomen**, bei denen die hormonsezernierenden Zellen positiv gefärbt waren, wurden der VPAC-1- (in 56 % der Fälle) und der VPAC-2-Rezeptor (in 60 % der Präparate) zu etwa gleichen Anteilen gefunden (Abb. 16).

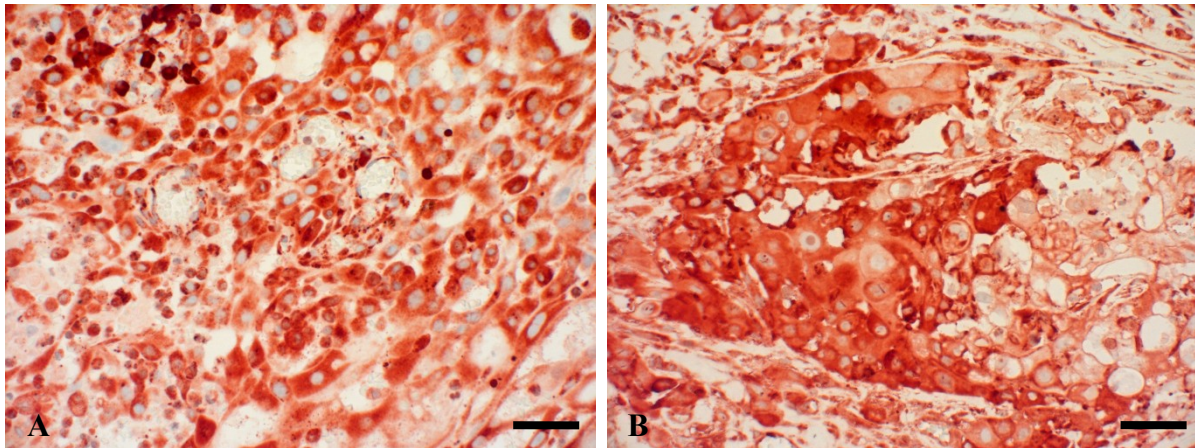


**Abb. 16:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Hypophysenadenomen mit dem Anti-VPAC-1- (A) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Etwa die Hälfte aller auf eine Expression des VPAC-1 und etwas mehr als die Hälfte der auf das Vorhandensein des VPAC-2 getesteten Hypophysenadenome war immungefärbt. Maßstabsbalken: A = B = 50  $\mu$ m.

Die entarteten Follikel­epithel­zellen aller getesteten **Schilddrüsen-Karzinome** waren sowohl VPAC-1- als auch VPAC-2-positiv (Abb. 17).

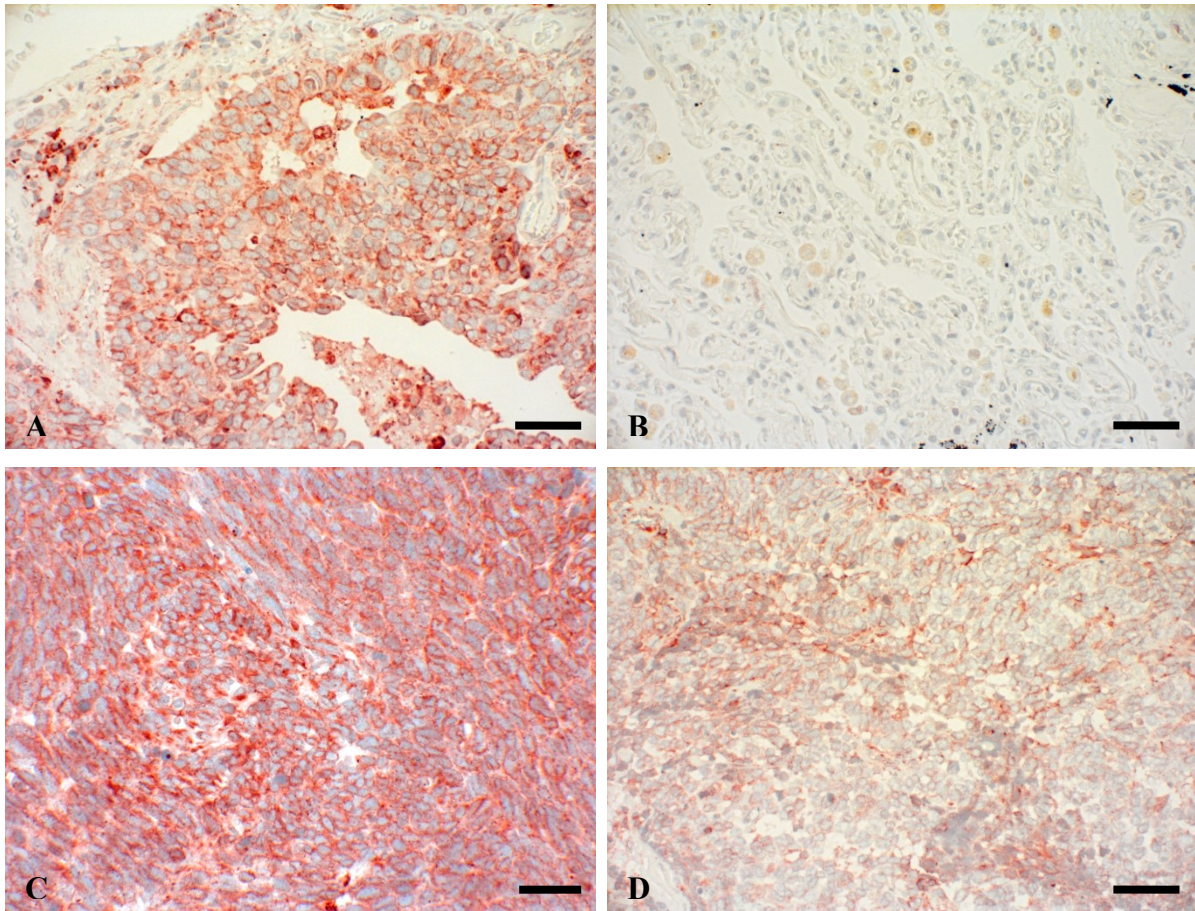
Bei der Auswertung der **mikronodulären Thymome** waren 50 % VPAC-1-positiv und in 67 % der Fälle konnte der VPAC-2-Rezeptor nachgewiesen werden. Oft war die Immunfärbung jedoch von zahlreichen ebenfalls positiven B- und T-Lymphozyten überlagert.





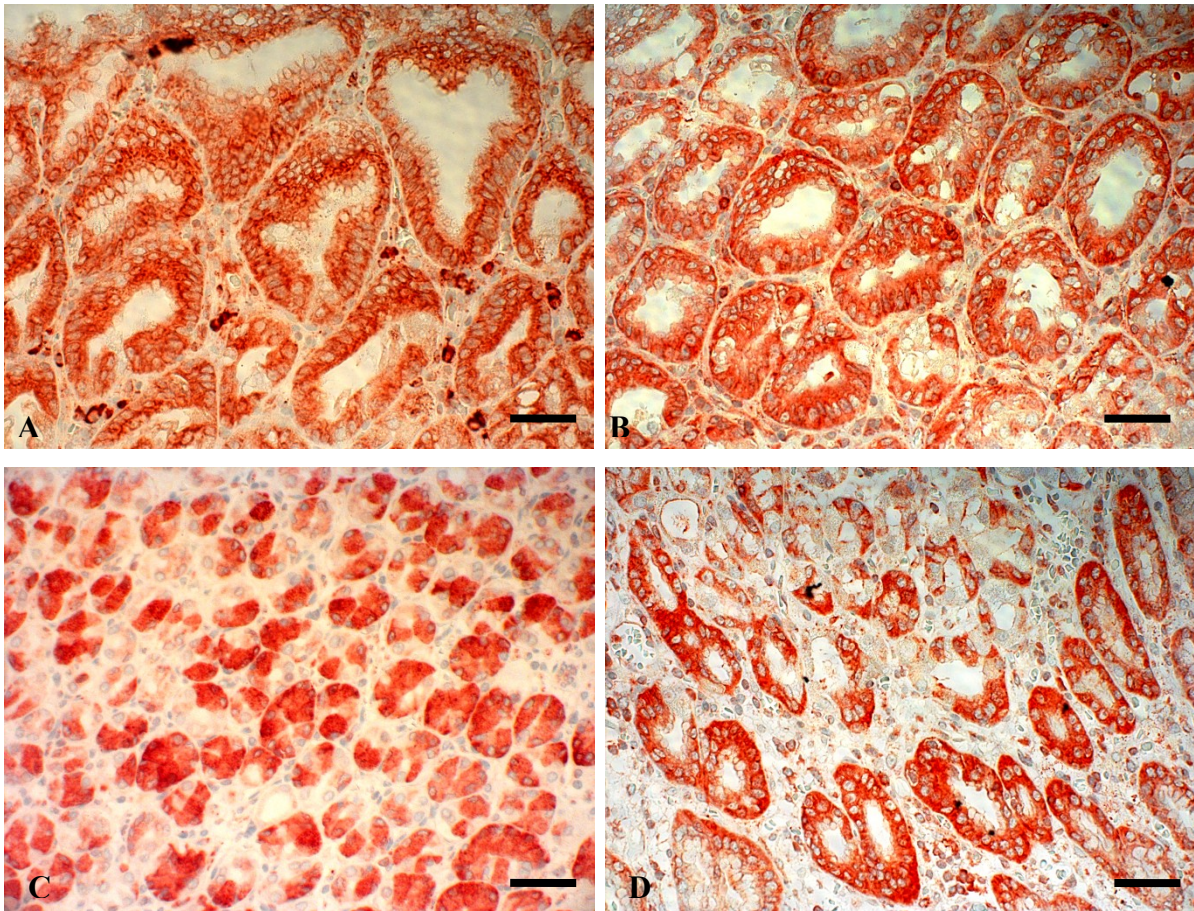
**Abb. 17:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Schilddrüsen-Karzinomen mit dem Anti-VPAC-1- (A) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Alle untersuchten Schilddrüsen-Karzinome waren bei beiden Antikörpern stark immungefärbt. Maßstabsbalken: A = B = 50 µm.

**Lungen-Karzinome** wiesen, je nach Entität, eine schwächere oder stärkere Immunfärbung des entarteten Gewebes auf, waren aber insgesamt mit einem eher niedrigeren IRS von ca. 3,9 beim VPAC-1 und ca. 3,0 beim VPAC-2 zu bewerten (siehe Tabellen 3 und 4). 69 % aller Lungen-Karzinome waren VPAC-1- und nur 25 % VPAC-2-positiv. Der letztere geringe Wert ist auf eine fehlende Färbung aller Adeno- und Plattenepithel-Karzinome zurückzuführen, trotz 60 % membranständig gefärbter kleinzelliger Bronchial-Karzinome. Bei den Plattenepithel-Karzinomen waren ebenfalls nur 33 % VPAC-1-positiv, jedoch fanden sich jeweils 80 % positive Adeno- und kleinzellige Bronchial-Karzinome (Abb. 18).



**Abb. 18:** Immunhistochemische Färbungen an humanen kleinzelligen Bronchial-Karzinomen und Adeno-Karzinomen mit dem Anti-VPAC-1- (A, C) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B, D) (rotbraune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Bei der Immunfärbung der Lungen-Karzinome war eine große inter- und intraindividuelle Variabilität zu beobachten. A, B: Adeno-Karzinom, C, D: Kleinzelliges Bronchial-Karzinom. Maßstabsbalken: A = B = D = 50  $\mu$ m, C = 30  $\mu$ m.

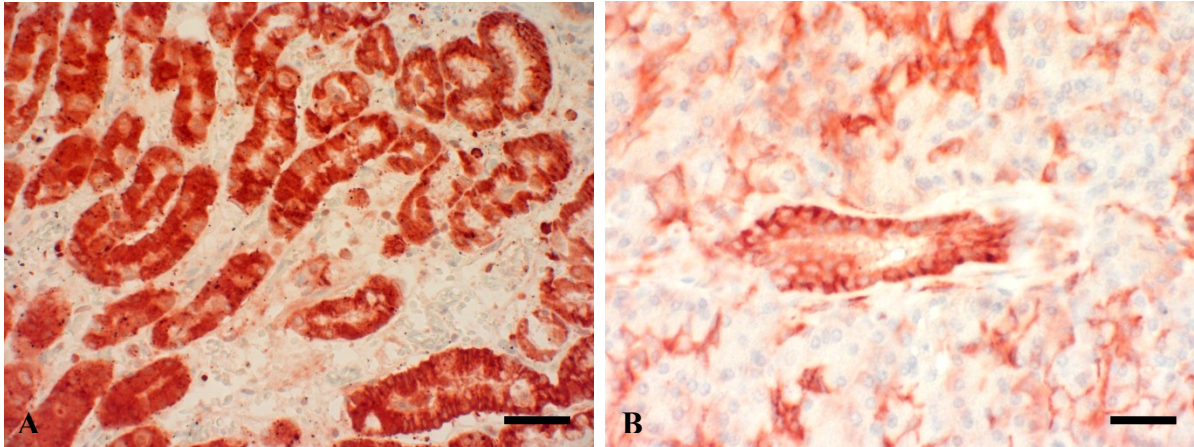
Die **Tumore des Magen-Darm-Traktes** zeigten eine außerordentlich starke membranständige Immunfärbung des Tumorgewebes. Proliferierende Gefäße waren ebenso positiv, wie entartetes Darmgewebe aller Abschnitte. 100 % der Gewebeschnitte, die mit dem VPAC-2-Antikörper untersucht worden waren, zeigten eine deutliche Färbung und bei etwa 97 % war das Anti-VPAC-1-Immunsignal stark positiv (Abb. 19).



**Abb. 19:** Immunhistochemische Färbungen an humanem Tumorgewebe vom Magen-Darm-Trakt mit dem Anti-VPAC-1- (A, C) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B, D) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Bei nahezu allen Tumoren des Magen-Darm-Traktes war eine intensive und membranständige Immunfärbung der Tumorzellen zu beobachten. A, B: Magen-Antrum-Karzinom, C, D: Magen-Korpus-Karzinom. Maßstabsbalken: A = B = C = D = 50 µm.

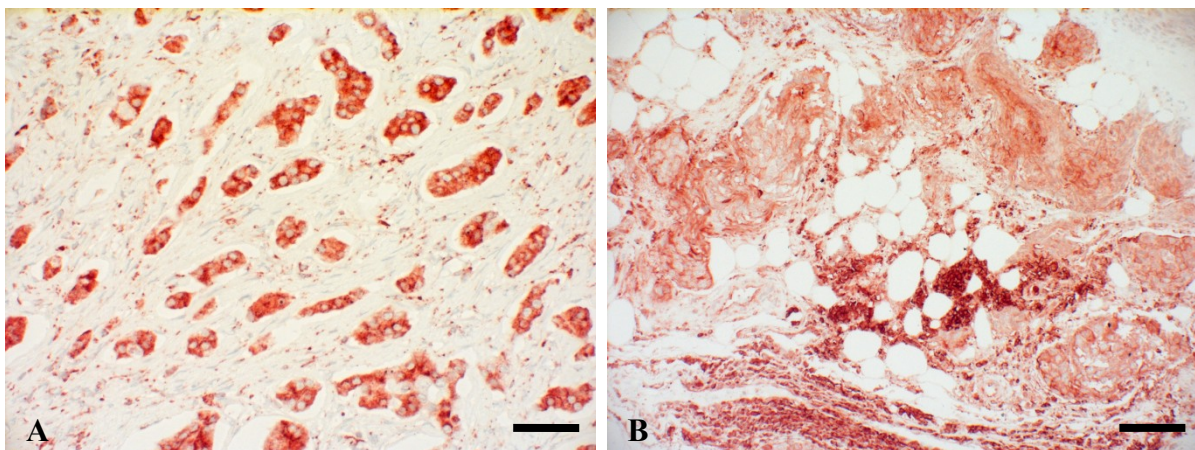
Bei den **Pankreas-Karzinom**-Präparaten ergab sich bei Testung auf den VPAC-1-Rezeptor zu 100 % eine membranständige Immunfärbung der Tumorzellen. Ein ähnliches Ergebnis war jedoch nur bei 40 % der mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper untersuchten Gewebeschnitte zu beobachten (Abb. 20).

Die analysierten **Phäochromozytome** waren in 67 % der Fälle VPAC-1-positiv, jedoch ohne eine intensive Färbung. Im Gegensatz dazu konnte in keinem der Präparate der VPAC-2 nachgewiesen werden.



**Abb. 20:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Pankreas-Karzinomen mit dem Anti-VPAC-1- (A) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Alle auf den VPAC-1 hin untersuchten Pankreas-Karzinome waren immungefärbt, jedoch wurde der VPAC-2-Rezeptor in nur etwa der Hälfte der Schnitte gefunden. Maßstabsbalken: A = B = 50  $\mu$ m.

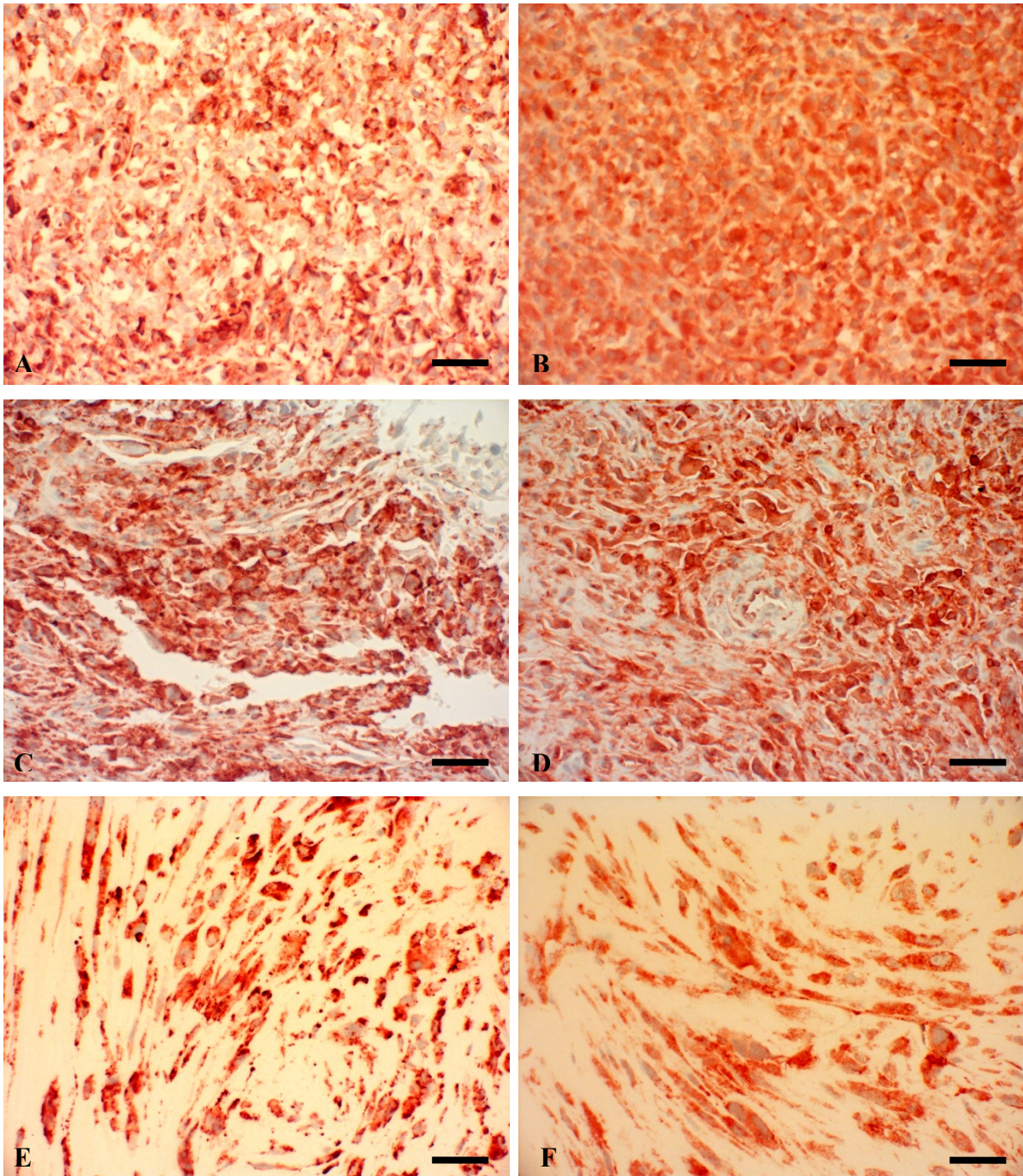
79 % der untersuchten **neuroendokrinen Tumore (NET)** wiesen eine membranständige Färbung für den VPAC-1-Rezeptor auf, jedoch zeigte sich eine VPAC-2-Expression bei nur 43 % der Fälle (Abb. 21). Insgesamt bestand eine große interindividuelle Variabilität, die sich in einem breiten IRS-Spektrum zeigte (siehe Tabellen 3 und 4).



**Abb. 21:** Immunhistochemische Färbungen an humanem neuroendokrinen Tumorgewebe mit dem Anti-VPAC-1- (A) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Bei den neuroendokrinen Tumoren waren etwas weniger als die Hälfte VPAC-2- und 79 % VPAC-1-positiv. Maßstabsbalken: A = 50  $\mu$ m, B = 100  $\mu$ m.

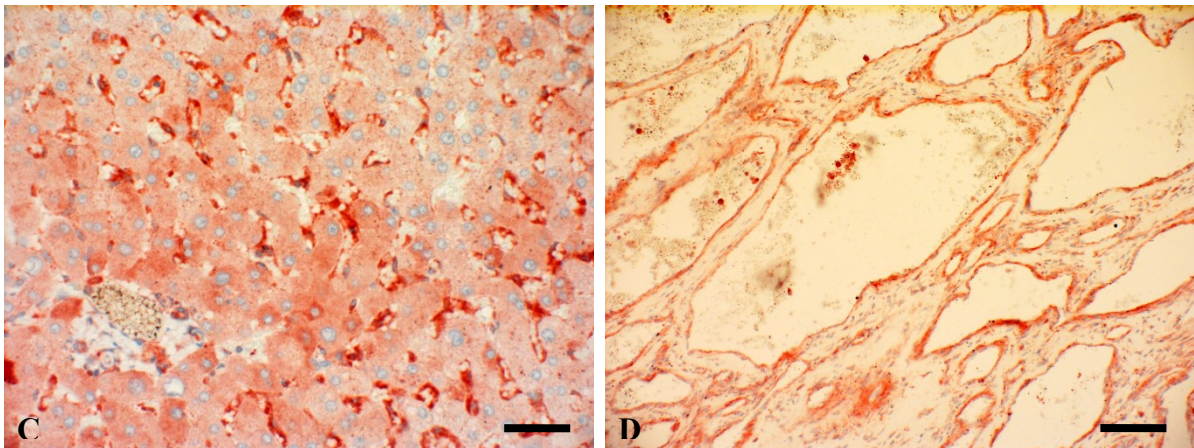
Die Gesamtzahl immungefärbter **Sarkome** war mit 63 % (VPAC-1) bzw. 53 % (VPAC-2) für beide Rezeptoren nicht allzu unterschiedlich. Die Unterschiede lagen in der Färbung der einzelnen Entitäten: In keinem pleomorphen Sarkom war der VPAC-1-Rezeptor

nachzuweisen, 50 % dieser Sarkome waren hingegen VPAC-2-positiv. Bei Leiomyosarkomen war wiederum kein VPAC-2-Rezeptor aufzuzeigen, jedoch konnte in 50 % der Fälle der VPAC-1 nachgewiesen werden. Weiterhin war in nur zwei Dritteln aller getesteten Rhabdomyosarkome der VPAC-2-Rezeptor festzustellen, der VPAC-1 war dagegen in allen Präparaten dieser Entität zu finden. Alle Angio- und Osteosarkome wiesen eine VPAC-1- bzw. VPAC-2-Immunfärbung auf. Jeweils ein Viertel aller Liposarkome war VPAC-1- bzw. VPAC-2-positiv (Abb. 22).



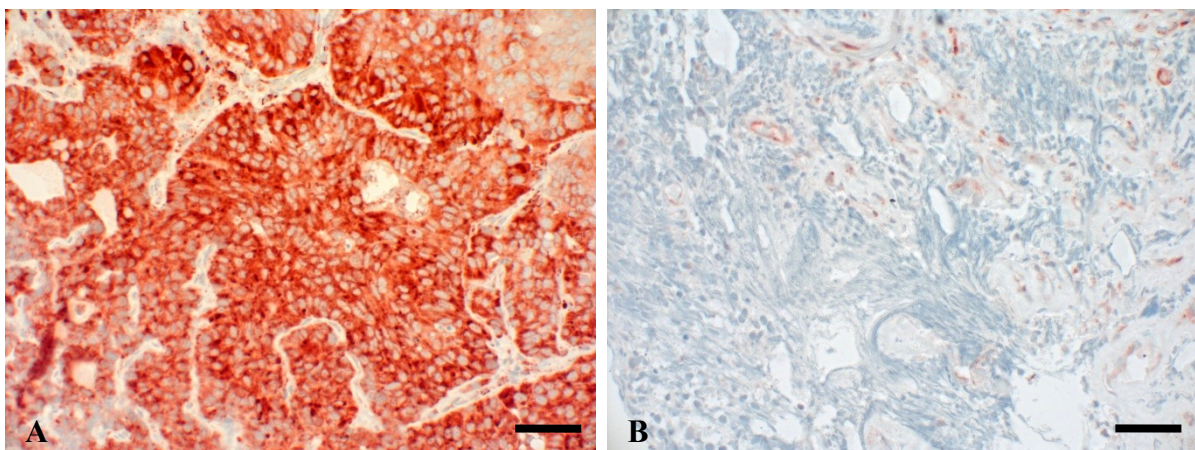
**Abb. 22:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Sarkomen mit dem Anti-VPAC-1- (**A, C, E**) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (**B, D, F**) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In allen vorhandenen Angiosarkomen und in der Mehrzahl der getesteten Rhabdomyosarkome war eine Immunfärbung zu beobachten. **A, B:** Angiosarkom. **C, D:** Rhabdomyosarkom, **E, F:** Osteosarkom. Maßstabsbalken: **A = B = C = D = E = F = 50 µm.**

Die Auswertung der Färbungen der **Hämangiome** ergab bei allen Gewebeschnitten eine Immunfärbung der proliferierenden Gefäße, sowohl für den VPAC-1 als auch für den VPAC-2 (Abb. 23).



**Abb. 23:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Hämangiomen mit dem Anti-VPAC-1- (A) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Beide Hämangiome waren VPAC-1- und VPAC-2-positiv. Maßstabsbalken: A = B = 50 µm.

Die Immunfärbungen der **Prostata-** und **Harnblasen-Karzinome** ergaben ein gemischtes Bild. Bei 44 % aller Prostata- und 71 % der Harnblasen-Karzinome war mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper eine membranständige Immunfärbung des Tumors festzustellen. Bei dem Anti-VPAC-2-Antikörper war dies nur bei 25 % bzw. 43 % der Präparate der Fall (Abb. 24).



**Abb. 24:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Harnblasen-Karzinomen mit dem Anti-VPAC-1- (A) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Knapp drei Viertel aller untersuchten Harnblasen-Karzinome war VPAC-1-positiv, wohingegen in weniger als der Hälfte der Präparate der VPAC-2-Rezeptor aufzufinden war. Maßstabsbalken: A = B = 50 µm.

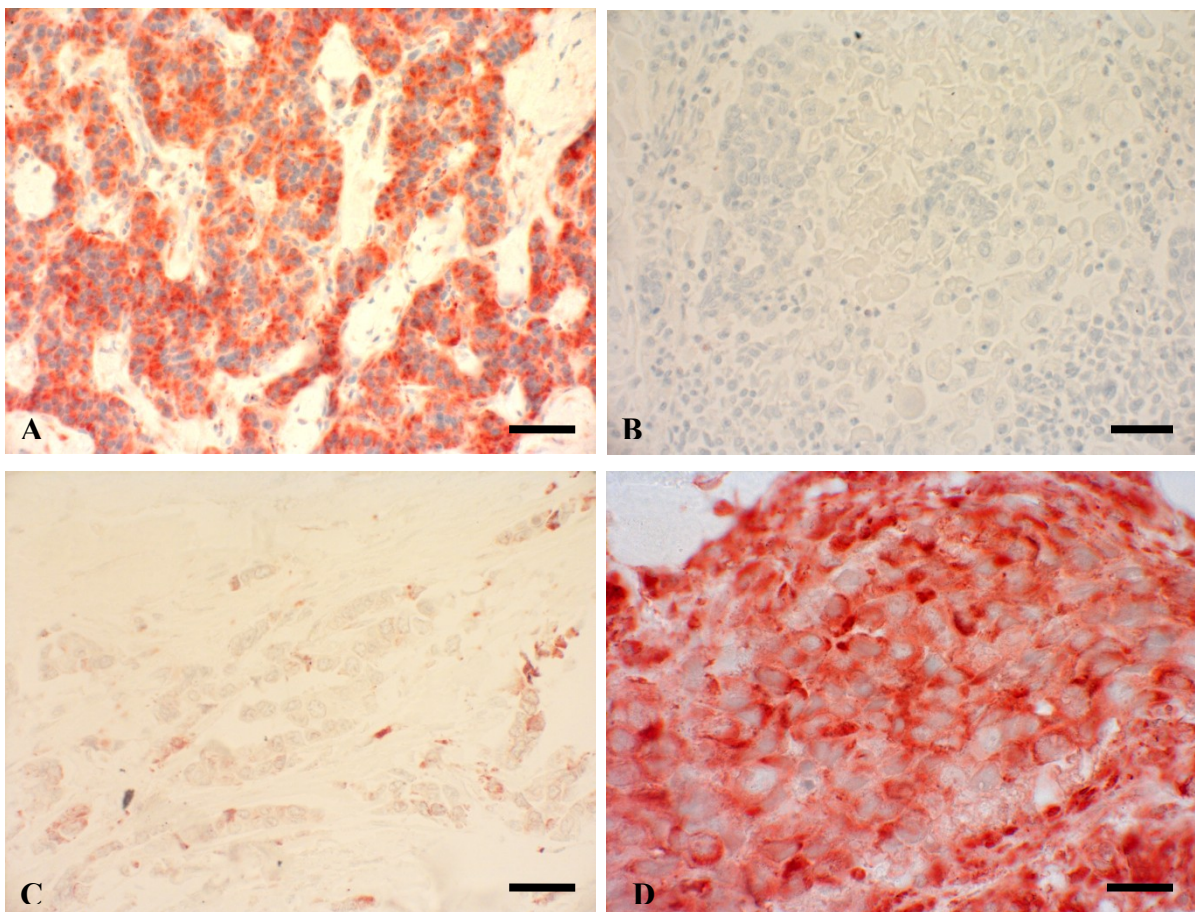
Die Auswertung der **Mamma-Karzinome** ergab in 67 % der Fälle eine VPAC-1 Färbung und in 75 % der Präparate eine VPAC-2-Expression. Hier waren insbesondere entdifferenzierte

Drüsenendstücke, aber auch Gefäße innerhalb des Tumorstromas stark immungefärbt (Abb. 25).

Deutliche Unterschiede zwischen der VPAC-1- und der VPAC-2-Färbung zeigten sich bei den **Ovarial-Karzinomen**. Während 93 % der mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper untersuchten Präparate eine membranständige Immunfärbung aufwiesen, fand sich ein entsprechendes Immunsignal nur bei 50 % der Präparate, die mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper untersucht worden waren.

Ähnlich war die Verteilung bei den **Cervix-Karzinomen**, bei denen alle getesteten Fälle den VPAC-1-Rezeptor aufwiesen, aber nur 56 % eine Immunfärbung für den VPAC-2-Rezeptor zeigten (Abb. 25).

Bei den **Endometriose**-Gewebeschnitten konnten weder VPAC-1- noch VPAC-2-Rezeptoren gefunden werden.



**Abb. 25:** Immunhistochemische Färbungen an humanen Mamma- und Cervix-Karzinomen mit dem Anti-VPAC-1- (A, C) und dem Anti-VPAC-2-Antikörper (B, D) (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. In den Cervix-Karzinomen wurde hauptsächlich der VPAC-1-Rezeptor gefunden, wohingegen in den Mamma-Karzinomen der Anteil der VPAC-2-Rezeptoren etwas überwog. **A, B:** Cervix-Karzinom, **C, D:** Mamma-Karzinom. Maßstabsbalken: **A = B = C = 50 µm, D = 30 µm.**



**Tabelle 3:** Auswertung der immunhistochemischen VPAC-1-Färbungen der humanen pathologischen und neoplastischen Gewebe anhand des immunreaktiven Scores (IRS). MW = mittlerer IRS-Wert, min. = minimaler IRS-Wert, max. = maximaler IRS-Wert.

Tumortyp (n = Gesamtzahl)	VPAC-1- positive Fälle	IRS VPAC-1 MW min. max.		
Glioblastom (n = 1)	0	0	0	0
Hypophysenadenom (n = 25)	14	2,2	1	6
Schilddrüsen-Karzinom (n = 2)	2	9,0	9	9
mikronoduläres Thymom (n = 6)	3	1,3	1	2
Lungentumor (n = 13)	9	3,9	1	9
Kleinzelliges Bronchial-Karzinom (n = 5)	4	5,5	1	9
Adeno-Karzinom (n = 5)	4	2,8	1	6
Plattenepithel-Karzinom (n = 3)	1	2,0	2	2
Tumore des Magen-Darm-Traktes (n = 30)	29	5,6	1	9
Magen-Antrum-Karzinom (n = 4)	4	6,8	6	9
Magen-Korpus-Karzinom (n = 13)	13	7,2	4	9
diffuses Magen-Karzinom (n = 4)	3	1,3	1	2
intestinales Magen-Karzinom (n = 5)	5	6,6	2	9
gastrointestinaler Stromatumor (n = 4)	4	1,0	1	1
Pankreas-Karzinom (n = 11)	11	6,6	1	12
Phäochromozytom (n = 3)	2	3,5	1	6
Neuroendokriner Tumor (n = 66)	52	5,5	1	12
Sarkom (n = 19)	12	5,5	1	12
Liposarkom (n = 4)	1	1,0	1	1
pleomorphes Sarkom (n = 2)	0	0	0	0
Rhabdomyosarkom (n = 3)	3	6,3	1	9
Leiomyosarkom (n = 4)	2	2,0	2	2
Angiosarkom (n = 2)	2	12,0	12	12
Osteosarkom (n = 4)	4	4,0	1	9
Hämangiom (n = 3)	3	3,7	2	6
Prostata-Karzinom (n = 9)	4	1,5	1	2
Harnblasen-Karzinom (n = 7)	5	4,8	2	12
Mamma-Karzinom (n = 3)	2	3,5	1	6
Ovarial-Karzinom (n = 14)	13	4,5	1	9
Endometriose (n = 1)	0	0	0	0
Cervix-Karzinom (n = 4)	4	6,5	1	12

**Tabelle 4:** Auswertung der immunhistochemischen VPAC-2-Färbungen der humanen pathologischen und neoplastischen Gewebe anhand des immunreaktiven Scores (IRS). MW = mittlerer IRS-Wert, min. = minimaler IRS-Wert, max. = maximaler IRS-Wert.

Tumortyp (n = Gesamtzahl)	VPAC-2- positive Fälle	IRS VPAC-2		
		MW	min.	max.
Glioblastom (n = 2)	1	1	1	1
Hypophysenadenom (n = 25)	15	2,9	1	9
Schilddrüsen-Karzinom (n = 2)	2	5,5	2	9
mikronoduläres Thymom (n = 6)	4	1,5	1	2
Lungentumor (n = 12)	3	3,0	1	6
Kleinzelliges Bronchial-Karzinom (n = 5)	3	3,0	1	6
Adeno-Karzinom (n = 5)	0	0	0	0
Plattenepithel-Karzinom (n = 2)	0	0	0	0
Tumore des Magen-Darm-Traktes (n = 31)	31	3,3	1	12
Magen-Antrum-Karzinom (n = 5)	5	4,6	1	9
Magen-Korpus-Karzinom (n = 14)	14	3,4	1	8
diffuses Magen-Karzinom (n = 3)	3	1,0	1	1
intestinales Magen-Karzinom (n = 5)	5	4,0	1	12
gastrointestinaler Stromatumor (n = 4)	4	1,8	1	3
Pankreas-Karzinom (n = 10)	4	3,5	2	6
Phäochromozytom (n = 5)	0	0	0	0
Neuroendokriner Tumor (n = 30)	13	2,0	0	6
Sarkom (n = 19)	10	4,9	1	8
Liposarkom (n = 4)	1	1,0	1	1
pleomorphes Sarkom (n = 2)	1	2,0	2	2
Rhabdomyosarkom (n = 3)	2	6,0	6	6
Leiomyosarkom (n = 4)	0	0	0	0
Angiosarkom (n = 2)	2	8,0	8	8
Osteosarkom (n = 4)	4	4,5	2	8
Hämangiom (n = 2)	2	7,0	6	8
Prostata-Karzinom (n = 8)	2	1,5	1	2
Harnblasen-Karzinom (n = 7)	3	2,3	1	4
Mamma-Karzinom (n = 8)	6	2,8	1	8
Ovarial-Karzinom (n = 12)	6	1,8	1	4
Endometriose (n = 1)	0	0	0	0
Cervix-Karzinom (n = 9)	5	4,4	1	9

### **5.3.3 Immunhistochemische Untersuchungen an normalem Rattengewebe**

#### **5.3.3.1 Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression des VPAC-1-Rezeptors an normalen Rattengeweben**

Weitere immunhistochemische Untersuchungen für den Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörper wurden an normalen Rattengeweben durchgeführt. Aufgrund einer hohen Sequenzähnlichkeit zum humanen VPAC-1 bzw. VPAC-2 war eine Kreuzreaktion zu erwarten, die sich schließlich auch bestätigte.

Auch bei den Rattengeweben wurde der VPAC-1-Rezeptor vor allem in den Gewebeschnitten des Darmes gefunden. Hier waren Anteile des Drüsengewebes, Lieberkühn-Darmkrypten, Becherzellen, Darmzotten und vereinzelte Zellen des gastroenteralen endokrinen Systems stark immungefärbt.

In den Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas wurde eine kräftige Immunfärbung aufgefunden, aber auch exokrine Azinuszellen waren membranständig, jedoch in der Intensität schwächer, gefärbt.

In den Präparaten des Gehirns war der ventrikuläre Plexus choroideus spezifisch und intensiv positiv, auch Pyramidenzellen der Großhirnrinde wiesen den VPAC-1-Rezeptor auf. Im Kleinhirn waren Purkinjezellen, in der Hypophyse einzelne hormone sezernierende Zellen stark immungefärbt.

Weiterhin zeigte sich bei den ganglionären Nervenzellperikarya ein sehr deutliches Immunsignal, das sich auch in den Nervenzellkörpern des Rückenmarks, verteilt über die gesamte graue Substanz, beobachten ließ.

Die Tunica Submucosa und die Tunica Muscularis des Magens, insbesondere die darin enthaltene glatte Muskulatur und die Gefäße, waren stark immungefärbt.

Auch die Tunica Muscularis des stark gewundenen Gangsystems der Samenblase, sowie das Zylinderepithel der Ductuli efferentes testis des Nebenhodens und die darin befindlichen Spermatozytenköpfe zeigten eine starke Positivität für den VPAC-1-Rezeptor.

Außerdem waren seröse Azini der Parotis, jedoch nicht die Schaltstücke, sowie das seröse Drüsengewebe der Tränendrüse stark und membranständig angefärbt.

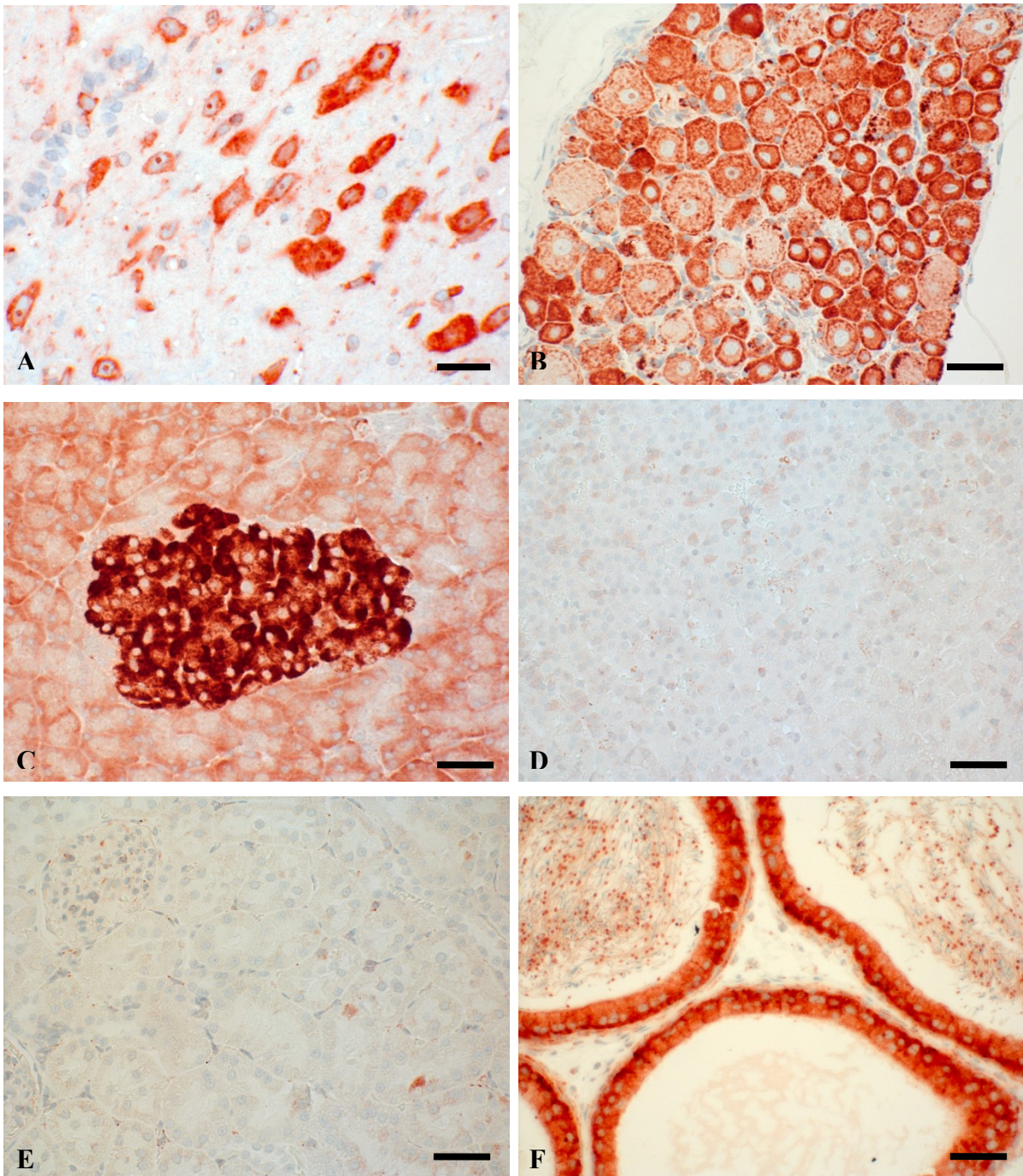
Nur sehr schwach ließen sich einzelne Schichten der Retina abbilden. Auch einzelne Lymphozyten in der Milz, das alveoläre Bindegewebsstroma und organspezifische Makrophagen der Lunge sowie einzelne exokrine Azini der Speicheldrüse waren sehr schwach VPAC-1-positiv.

Eine zarte Immunfärbung ließ sich bei den bindegewebigen interstitiellen Myofibroblasten des Hodens beobachten, wohingegen die Präparate des Herzens eine leichte Färbung der

Muskelzellen aufwiesen, die allerdings meist nicht membranständig und daher höchstwahrscheinlich unspezifisch war.

Ähnliche Färbungen waren auch bei den Gewebeschnitten der Leber, des Ovars und des Uterus zu beobachten: Die Färbung, ohne Bezug zu spezifischen Zellen und teils ohne Membranständigkeit, war zu großen Anteilen durch eine Positivität des glattmuskulären Stromas, der Gefäße und von lymphozytären Ansammlungen geprägt und daher ebenfalls höchstwahrscheinlich als unspezifisch zu bewerten.

Die Präparate der Niere, der Nebenniere, der Lymphknoten und des Thymus enthielten keinen VPAC-1-Rezeptor (Abb. 26).



**Abb. 26:** Immunhistochemische Färbungen an normalem Rattengewebe mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A:** Rückenmark, **B:** Ganglien, **C:** Pankreas, **D:** Nebenniere, **E:** Niere, **F:** Nebenhoden. Maßstabsbalken: **A** = 30  $\mu\text{m}$ , **B** = **C** = **D** = **E** = **F** = 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.3.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen zur Expression des VPAC-2-Rezeptors an normalen Rattengewebe

Ebenfalls wurde die Expression des VPAC-2-Rezeptors mittels des Anti-VPAC-2-Antikörpers untersucht. Als Organe mit starker Expression sind hier insbesondere Gewebeschnitte des Auges, bei dem alle Schichten der Retina in unterschiedlicher Intensität

gefärbt waren, und des Magen-Darm-Traktes, bei dem sich lymphozytäre Zellhaufen und das Drüsengewebe sehr gut darstellen ließen, hervorzuheben. Auch gehörten Becherzellen, Zotten, Darmkrypten und wahrscheinlich endokrin-aktive Zellen zu den abgrenzbaren Strukturen.

Eine spezifische und bei den Schaltstücken auch intensive membranständige Immunfärbung fand sich weiterhin in der Parotis, wohingegen die serösen Azini des Präparates nur schwach positiv waren. Ähnliches war bei der Glandula submandibularis zu beobachten, bei der die Schaltstücke stark immungefärbt waren.

In den Präparaten der Leber waren die Kupffer-Zellen vom restlichen Gewebe sehr gut abgrenzbar, da sie spezifisch und stark positiv waren.

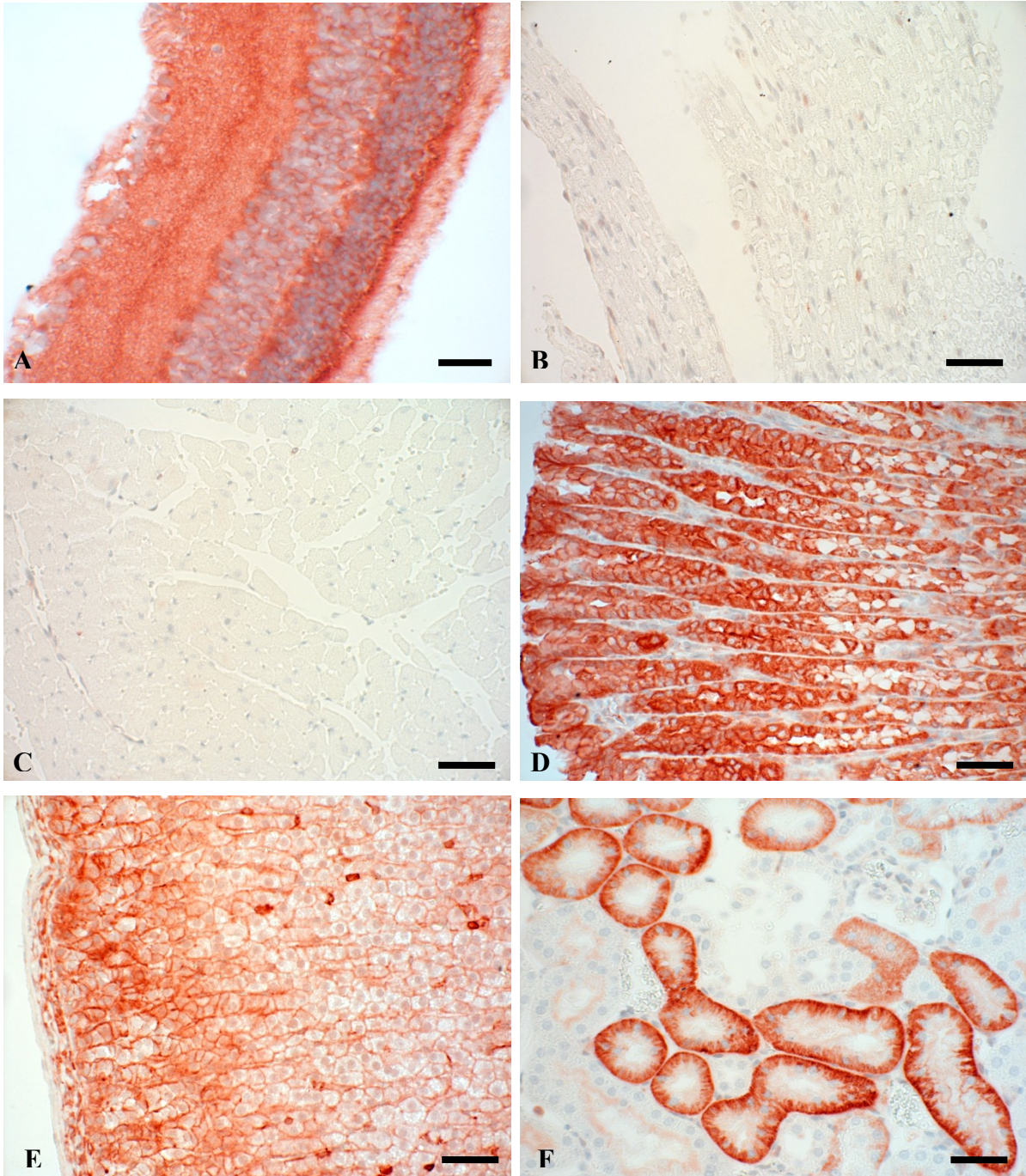
Die Langerhans-Inseln des endokrinen Pankreas, im Gegensatz zu dessen exokrinen Anteil, und die proximalen Tubuli der Niere wiesen ebenfalls ein spezifisches und intensives Immunsignal auf.

In den Gewebeschnitten der Nebenniere fand sich eine durchgehende VPAC-2-Expression in der gesamten Rinde, wobei jedoch die äußere Schicht, die Zona glomerulosa, am intensivsten angefärbt war.

Auch B-Lymphozyten in den Malpighi-Körperchen der Milz und insbesondere reife T-Lymphozyten in der Rindenregion des Thymus waren positiv für den VPAC-2-Rezeptor.

Nur sehr schwach bis kaum waren die Gewebeschnitte des Gehirns, der Hypophyse und des Rückenmarks angefärbt. Zellen, die hierbei zu erkennen waren, ließen auf keine spezifische Lokalisation, Art oder Membranständigkeit schließen. Ebenso verhielt es sich mit den Präparaten der Tränendrüse, der Lunge, von Lymphknoten, Uterus und Hoden. Auch hier waren, wenn mit leichter Intensität gefärbt, vordergründig nur glatte Muskelzellen, Gefäße und Lymphozyten zu erkennen.

Gewebeschnitte vom Herzen und der Spinalganglien zeigten keine VPAC-2-Expression (Abb. 27).



**Abb. 27:** Immunhistochemische Färbungen an normalem Rattengewebe mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper (rot-braune Färbung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin. **A:** Retina, **B:** Ganglien, **C:** Herz, **D:** Magen, **E:** Nebenniere, **F:** Niere. Maßstabsbalken: **A** = 30  $\mu\text{m}$ , **B** = **C** = **D** = **E** = **F** = 50  $\mu\text{m}$ .

## **6 Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war es, die monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-1- und -VPAC-2-Antikörper detailliert zu charakterisieren. Zum Nachweis der Spezifität dienten immunzytochemische Untersuchungen an stabil transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen, immunhistochemische Färbungen an normalen Human- und Rattengeweben sowie an humanen Tumorgeweben und Peptidneutralisationen. So war es möglich, ein ausführliches Rezeptor-Expressionsmuster in diesen Geweben zu erstellen.

### **6.1 Immunzytochemische Färbungen an HEK-293-Zellen**

Zur Detektion der humanen VPAC-1- und VPAC-2-Rezeptoren wurden HEK-293-Zellen stabil mit jeweils dem VPAC-1- bzw. dem VPAC-2-Rezeptor transfiziert und mit den monoklonalen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörpern immunzytochemisch untersucht. Die humanen Rezeptoren werden, wie es für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren üblich ist, auf den Zellmembranen der HEK-293-Zellen exprimiert, sodass getestet werden konnte, ob die Antikörper ihr jeweiliges Antigen und somit ihren Rezeptor spezifisch binden können. Hierfür wurden die HEK-293-VPAC-1-Zellen mit dem monoklonalen Anti-VPAC-1-Antikörper und die HEK-293-VPAC-2-Zellen mit dem monoklonalen Anti-VPAC-2-Antikörper behandelt. Um weiterhin auch noch eine mögliche Kreuzreaktivität dieser Antikörper zu untersuchen, wurden zusätzlich die HEK-293-VPAC-1-Zellen auch mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper bzw. die HEK-293-VPAC-2-Zellen mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper behandelt. Da die jeweilige Zelllinie nur einen von beiden Rezeptoren auf ihrer Zellmembran exprimiert, den jeweils anderen jedoch nicht, konnte so überprüft werden, inwiefern die Antikörper an andere, verwandte Antigene binden. Zusätzlich wurde die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren typische Rezeptorinternalisierung in Abhängigkeit von der Zeit (0 min, 15 min und 30 min) und Konzentration des Rezeptoragonisten PACAP (25 nM und 2,5  $\mu$ M) untersucht.

Nach der Inkubation der HEK-293-VPAC-1-Zellen mit dem monoklonalen Anti-VPAC-1-Antikörper war eine starke membranständige Immunfluoreszenz und eine nur gering ausgeprägte intrazelluläre perinukleäre Färbung zu beobachten. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch nach der Inkubation der HEK-293-VPAC-2-Zellen mit dem monoklonalen Anti-VPAC-2-Antikörper. Somit konnte die membranständige Lokalisation der Rezeptoren auf zellulärer Ebene gezeigt werden, wie es bereits aus vorherigen Untersuchungen bekannt und daher zu erwarten war (Goetzl 2006, Mahavadi et al. 2013, Schulz et al. 2004, Shetzline et al. 2002, Valdehita et al. 2010, Yang et al. 2009). Auch konnte immunzytochemisch eine



Kreureaktivität mit dem jeweiligen anderen Antigen bei den untersuchten Antikörpern ausgeschlossen werden, so wie auch in der Literatur beschrieben. Schulz und Kollegen verwendeten zwar polyklonale Antikörper, diese waren jedoch gegen die gleiche Sequenz des VPAC-1- bzw. des VPAC-2-Rezeptors erzeugt worden, wie die in der vorliegenden Arbeit verwendeten monoklonalen Antikörper (Schulz et al. 2004). Weiterhin konnte festgestellt werden, dass 2,5  $\mu$ M PACAP eine geeignetere Agonisten-Konzentration ist, als 25 nM PACAP, da bei der letzteren niedrigeren Konzentration auch nach 30 min eine Rezeptorinternalisierung größtenteils ausblieb. In der Literatur geht man davon aus, dass erst ab hohen VIP-Konzentrationen eine Rezeptorinternalisierung stattfindet (Yang et al. 2009), andere Autoren fanden eine deutliche Internalisierung bei einer VIP-Konzentration von 100 nM (Shetzline et al. 2002) oder 1  $\mu$ M (Schulz et al. 2004). Die Beobachtung, dass bei 0 min (ohne Ligandenstimulation) keine, bei 15 min bereits eine leichte und bei 30 min die maximale Rezeptorinternalisierung zu verzeichnen ist, konnte auch von anderen Autoren gemacht werden (Schulz et al. 2004, Shetzline et al. 2002).

## **6.2 Western-Blot-Analysen**

Weiterhin wurden die neu entwickelten monoklonalen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörper in Western-Blot-Analysen eingesetzt, um einen weiteren Spezifitätsnachweis zu erbringen. Hierfür wurden zum einen stabil mit dem VPAC-1- bzw. dem VPAC-2-Rezeptor transfizierte HEK-293-Zellen und zum anderen Gewebeproben aus dem Dünndarm, dem Dickdarm, dem Magen, dem Hoden, der Milz, dem Hirn und des Pankreas der Maus untersucht.

Der Anti-VPAC-1-Antikörper detektierte bei den HEK-293-VPAC-1-Zellen eine breite Bande zwischen 50 und 100 kDa. Ähnliche Arbeiten an HEK-293-VPAC-1-Zellen lieferten vergleichbare Ergebnisse, wobei die VPAC-1-Rezeptoren bei 50 – 71 kDa (Shreeve et al. 2000), 55 – 70 kDa (Schulz et al. 2004) oder 60 – 80 kDa (Shetzline et al. 2002) detektiert wurden. Der Anti-VPAC-2-Antikörper wiederum führte bei den HEK-293-VPAC-2-Zellen zu einer breiten Bande zwischen 55 und 100 kDa. Andere Arbeiten, in denen ebenfalls HEK-293-VPAC-2-Zellen untersucht worden waren, zeigten ein Molekulargewicht von 50 – 65 kDa (Schulz et al. 2004). Weiterhin erschienen weder Banden bei der Behandlung der HEK-293-VPAC-1-Zellen mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper noch bei der Untersuchung der HEK-293-VPAC-2-Zellen mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper, womit auch hier Kreuzreaktionen innerhalb der VPAC-Rezeptorfamilie ausgeschlossen werden konnten.

Bei den Western-Blot-Analysen an den Mausgeweben zeigte sich ein gemischtes Bild. Nach Behandlung der Gewebe mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper wurden breite Banden zwischen 50 und 70 kDa beim Magen, beim Pankreas und, schwächer ausgeprägt, bei der Milz beobachtet. Beim Dickdarm und beim Hirn zeigte sich in diesem Bereich jedoch nur ein schwaches Signal, wohingegen beim Dünndarm und beim Hoden keinerlei Banden verzeichnet werden konnten. Obwohl das Molekulargewicht vom Grad der Rezeptor-Glykosylierung abhängt, welche abhängig vom untersuchten Organ und von der verwendeten Spezies variieren kann (Moody et al. 2003), lassen sich in der Literatur stets analoge Messwerte finden. So beschreiben auch Kato et al. die Größe des VPAC-2-Rezeptors im untersuchten murinen Kolongewebe bei etwa 65 kDa (Kato et al. 2012) und Yang und Mitarbeiter stellten den Rezeptor im Rattenhirn bei 54 kDa dar (Yang et al. 2013). Weitere Ergebnisse mit anderen Geweben stützen das geschilderte Molekulargewicht des VPAC-2-Rezeptors: etwa 47 kDa im Corpus cavernosum der Ratte (Zhang et al. 2010), 52 kDa in bulbären Becherzellen und in der Konjunktiva der Ratte, 55 kDa in Schwann-Zellen (Castorina et al. 2008), 65 kDa im Ganglion sphenopalatinum und im humanen Uterus (Bajo et al. 2000, Csati et al. 2012), 68 kDa in der humanen Lunge (Busto et al. 2000) oder 70 kDa in der humanen Prostata (García-Fernández et al. 2003). Auch im Tumorgewebe wurde der Rezeptor in einer Größe zwischen 50 kDa (Kaisler 2008) und 70 kDa (García-Fernández et al. 2005) entdeckt.

Bei den Western-Blot-Analysen der normalen Mausgewebe mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper ließen sich dagegen keine spezifischen, sondern nur unspezifische Banden darstellen. Jedoch berichten auch andere Autoren in der aktuellen Literatur von spezifischen Banden in zahlreichen Geweben, die den VPAC-1-Rezeptor repräsentieren und deren Bandbreite sich von 47 kDa bis 80 kDa erstreckt (Bajo et al. 2000, Busto et al. 2000, Csati et al. 2012, García-Fernández et al. 2003, Karacay et al. 2001, Moody et al. 2003, Yang et al. 2013). Die VPAC-1-Rezeptoren im Tumorgewebe liegen mit 67 kDa (García-Fernández et al. 2005) bzw. 68 kDa beim Mamma-Karzinom (Valdehita et al. 2010) beim etwa gleichen Molekulargewicht.

Als weiterer Nachweis der Spezifität wurden außerdem Peptidneutralisationen durchgeführt. Die zuvor mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper detektierten Banden waren nun nicht mehr sichtbar, wie es auch bereits mit anderen polyklonalen Antikörpern beschrieben worden war (Schulz et al. 2004). Die durch den Anti-VPAC-1-Antikörper erzeugten unspezifischen Banden blieben jedoch weiterhin bestehen.

Die hier dargestellten Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchungen und der Western-Blot-Analysen sprechen dafür, dass die neu entwickelten monoklonalen humanen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörper größtenteils spezifisch sind und keine Kreuzreaktionen aufweisen.

### **6.3 Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Humangeweben**

Mit den humanen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörpern wurden monoklonale Antikörper erzeugt, die den VPAC-1- bzw. insbesondere den VPAC-2-Rezeptor erstmals mit hoher Spezifität detektieren können. Bisher war eine ausführliche Charakterisierung der Lokalisation dieser Rezeptoren in humanen Geweben mangels guter monoklonaler und fehlender spezifischer polyklonaler Antikörper nur bedingt möglich (Schulz et al. 2014). Mit den nun vorliegenden spezifischen monoklonalen Antikörpern ist es jetzt möglich, ein vollständiges und detailliertes VPAC-Rezeptor-Expressions-Profil in normalen Humangeweben zu erstellen.

Die VPAC-Rezeptoren sind im gesamten menschlichen Körper und in vielen Organen weitverbreitet vorzufinden (Conconi et al. 2006, Morelli et al. 2008). Da sie oft aber auch nur auf einzelnen Strukturen eines Gewebes exprimiert werden, wie auf Astrozyten (Masmoudi-Kouki et al. 2007), auf Lymphozyten (Dorsam et al. 2011, Harfi et al. 2004) oder auf Monozyten (Harfi et al. 2004), stellt die immunhistochemische Färbung die Methode der Wahl dar, um die exakte Lokalisation der Rezeptoren in verschiedenen Geweben aufzuzeigen. Als limitierend erwies sich allerdings, dass die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Untersuchungen an VPAC-Rezeptoren an Mäusen oder an Ratten durchgeführt wurden. Informationen über die VPAC-Expression in normalen Humangeweben fehlen aber bislang. Aufgrund der Sequenzunterschiede der Rezeptoren und bereits bekannter Spezies-spezifischer Expressionsunterschiede, können Expressions-Profile, die an Mäusen oder an Ratten erarbeitet worden sind, nicht ohne Weiteres auf den Menschen übertragen werden (Harmar et al. 2004, Schulz et al. 2004). Daher soll hier zunächst die mit den neuen Antikörpern ermittelte Expression des VPAC-1- und des VPAC-2-Rezeptors auf verschiedenen menschlichen Geweben dargestellt werden.

Eine intensive und membranständige Färbung ergab der Anti-VPAC-1-Antikörper im gesamten **Magen-Darm-Trakt**, wobei der **VPAC-1**-Rezeptor in der glatten Muskulatur, in den Lieberkühn-Darmkrypten, in Becherzellen, in Dünndarmzotten und in vereinzelt Zellen des gastroenteralen endokrinen Systems detektiert wurde. In der Literatur ist bereits seit

längerem bekannt, dass der VPAC-1-Rezeptor im humanen Dünndarm exprimiert wird. Schulz und Kollegen wiesen eine Expression in der Dünndarm-Mukosa, in den Epithelzellen der basalen Darmkrypten und zusätzlich in myenterischen Neuronen nach. Jedoch wird von keiner VPAC-1-Expression im Magen, in Becherzellen, in der glatten Muskulatur oder in endokrinen Zellen berichtet (Schulz et al. 2004).

Eine deutliche VPAC-1-Expression im **Cortex** zeigte sich in Pyramidenzellen der Großhirnrinde und in Ependymzellen des Ventrikelsystems. Bereits 2007 hat eine Forschergruppe herausgefunden, dass der VPAC-1-Rezeptor auf Astrozyten exprimiert wird und dort in wichtige Aufgaben des astrozytären Metabolismus involviert ist (Masmoudi-Kouki et al. 2007). Basille und Kollegen konnten außerdem den VPAC-1-Rezeptor in der inneren und der äußeren Granulosa-Zellschicht des Kleinhirn-Cortex nachweisen und zeigen, dass er funktionell an der Neuro-Entwicklung und der Neuro-Protektion beteiligt ist (Basille et al. 2006). Dass humane Ependymzellen ebenfalls den VPAC-1-Rezeptor aufweisen, wird in der Literatur nicht erwähnt.

Auch ist in der Literatur nicht beschrieben, ob humane Follikel-epithelzellen der **Schilddrüse** VPAC-1-positiv sind, obwohl der Anti-VPAC-1-Antikörper in der vorliegenden Arbeit sein Antigen dort membranständig und spezifisch detektieren konnte.

Weiterhin wiesen im **Pankreas** die apikalen Anteile der Azinuszellmembranen und die Schaltstücke eine membranständige Immunfärbung für den VPAC-1-Rezeptor auf. Ahrén untersuchte das humane Pankreas 2008 auf das Vorhandensein von VPAC-Rezeptoren, fand den VPAC-1-Rezeptor jedoch nur in den Blutgefäßen um die Langerhans-Inseln herum, nicht aber direkt im exokrinen Anteil (Ahrén 2008).

Lymphozyten verschiedener Gewebe, ob organotypisch oder durch entzündliche Reaktionen bedingt, waren, wie erwartet, sehr häufig für den VPAC-1-Rezeptor positiv. So zeigte der Anti-VPAC-1-Antikörper eine Immunfärbung der B-Lymphozyten in der Mantelzone der **Milz**, der T-Lymphozyten der parafollikulären Zone der **Lymphknoten** und der T-Lymphozyten im interfollikulären Raum der **Tonsille** auf. Zudem waren B-Lymphozyten im normalen **Thymus**gewebe, welches an mikronoduläre Thymome angrenzte, schwach VPAC-1-positiv. Mehrere Autoren weisen darauf hin, dass der VPAC-1-Rezeptor in CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten in verschiedenen Geweben konstitutiv exprimiert wird (Burian et al. 2010, Dorsam et al. 2011, Goetzl et al. 2001, Goetzl 2006, Harfi et al. 2004, Pozo et al. 2003). Auch scheint der VPAC-1-Rezeptor direkt mit einer entzündlichen Immunantwort verbunden zu sein, da die VPAC-1-Dichte auf Lymphozyten durch eine induzierte Inflammation zunimmt (Storka et al. 2013). Neben Lymphozyten exprimieren auch Monozyten,

Makrophagen und Granulozyten den VPAC-1-Rezeptor (Burian et al. 2010, Harfi et al. 2004, Pozo et al. 2003, Storka et al. 2013, Yadav und Goetzl 2008), wodurch zu erklären ist, dass bei entzündlichen Vorgängen im untersuchten Gewebeschnitt große Teile des Präparates gefärbt sein können.

Die Färbung des humanen **Uterus** mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper erwies sich als unspezifisch, da keinerlei Membranständigkeit zu erkennen war und große Teile des Präparates wahllos gefärbt waren. Busto und Kollegen berichten von Makrophagen im Uterus, die den VPAC-1-Rezeptor tragen (Busto et al. 2000), was auch in den untersuchten Uterus-Präparaten möglich ist. Jedoch scheint die Forschergruppe um Bajo auch im normalen Uterusgewebe des Menschen ein VPAC-1-Signal gefunden zu haben (Bajo et al. 2000).

Auch die Untersuchung der humanen **Herz**-Präparate mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper war von nicht membranständigen Färbungen überlagert. Von anderen Autoren konnte der VPAC-1-Rezeptor jedoch in den kardialen Trabekeln des rechten Atriums und des linken Ventrikels detektiert werden (Saetrum Opgaard et al. 2001).

Ebenso unspezifisch waren die Färbungen der humanen **Leber**, da nicht genau nachzuweisen war, welche Strukturen VPAC-1-positiv waren und die gegebene Färbung größtenteils nicht membranständig war. In der Literatur sind bislang keine Angaben zur VPAC-1-Expression in der humanen Leber aufzufinden.

Die Gewebeschnitte der **Hypophyse**, des **Rückenmarks**, der **Spinalganglien**, der **Gallenblase**, der **Niere** und der **Zervix** waren komplett VPAC-1-negativ. Zu diesen Organen sind ebenfalls keine Daten anderer Autoren bekannt. Lediglich Bajo und Kollegen sowie Morelli und Kollegen berichten von VPAC-1-positiven Follikeln im Ovar (Bajo et al. 2000, Morelli et al. 2008). Dieses wurde jedoch nicht untersucht. Ebenfalls nicht gefärbt waren die in dieser Arbeit mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper analysierten humanen **Prostata**-Präparate. Im Gegensatz dazu konnten jedoch mehrere Autoren VPAC-1-positive Strukturen in der Prostata nachweisen (Collado et al. 2004, García-Fernández et al. 2003, Gutiérrez-Canas et al. 2005). Auch der Befund, dass die hier analysierten **Mamma**-Präparate VPAC-1-negativ waren, widerspricht der aktuellen Datenlage, laut der von verschiedenen Autoren VPAC-1-positive Strukturen in der humanen Mamma nachgewiesen werden konnten (García-Fernández et al. 2005, Valdehita et al. 2010). Möglicherweise ist die bisherige Nutzung der nur wenig spezifischen polyklonalen Anti-VPAC-Antikörper ursächlich für diese Fälle der Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und der derzeitigen Datenlage in der Literatur. Ein monoklonaler Antikörper, wie er hier verwendet wurde, ist einem polyklonalen in der Immunhistochemie hinsichtlich der Spezifität in der Regel überlegen.

Der **VPAC-2**-Rezeptor wurde mit einer hohen Intensität und Membranständigkeit in Gewebeschnitten des **Magen-Darm-Traktes** detektiert. So wie der VPAC-1- wurde auch der VPAC-2-Rezeptor in Becherzellen, in den Lieberkühn-Darmkrypten, im Darmepithel und in einigen Zellen des gastroenteralen endokrinen Systems nachgewiesen. In der aktuellen Literatur wird zwar wiederum berichtet, dass neuroendokrine Zellen, Blutgefäße und die glatte Muskulatur des Gastrointestinal-Traktes VPAC-2-positiv sind (Kato et al. 2012, Schulz et al. 2004), jedoch bleiben Becherzellen, Darmkrypten und das Darmepithel unerwähnt.

Obwohl sich mithilfe des Anti-VPAC-2-Antikörpers eine spezifische und membranständige Immunfärbung der proximalen Tubuli in den untersuchten humanen **Nieren**-Präparaten erzeugen ließ, konnten ähnliche Analysen an der humanen Niere in der Literatur nicht gefunden werden.

Präparate von humanen **Lymphknoten** enthielten den VPAC-2-Rezeptor auf B-Lymphozyten im Keimzentrum und auf T-Lymphozyten im Lymphozytenwall. Ebenso waren in der **Tonsille** T-Lymphozyten im interfollikulären Raum und B-Lymphozyten im Randwall membranständig und stark immungefärbt. Dahingegen waren B-Lymphozyten im Keimzentrum der **Milz** nur schwach positiv. Wie es durch vorangegangene Analysen anderer Autoren bereits erwartet worden war, wurden durch die Immunfärbung des VPAC-2-Rezeptors auch lymphozytäre Entzündungsreaktionen in weiteren Organen nachgewiesen. Im Gegensatz zum VPAC-1-Rezeptor, den Lymphozyten konstitutiv tragen (z.B. Goetzl et al. 2001), wird die Expression des VPAC-2-Rezeptors erst auf einen Immunreiz hin hochreguliert, sodass die VPAC-2-Rezeptordichte der Lymphozyten ansteigt (Goetzl et al. 2001, Goetzl 2006, Storka et al. 2013). So ist auch beschrieben, dass der VPAC-2-Rezeptor im menschlichen Körper auf Lymphozyten vorzugsweise an Orten entzündlicher Reaktionen exprimiert wird (Busto et al. 2000) sowie auch auf Makrophagen (Burian et al. 2010) und auf Monozyten (Storka et al. 2013).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen weiterhin, dass eine zwar schwache, jedoch spezifische und membranständige Expression des VPAC-2-Rezeptors auf Kupffer-Zellen in der humanen **Leber** zu beobachten ist. Zwar ist in der bisher vorhandenen Literatur kein Hinweis auf eine solche Rezeptor-Expression in diesem Organ zu finden, jedoch sind Kupffer-Zellen nichts anderes als organspezifische Makrophagen der Leber und, wie schon weiter oben beschrieben, auch Makrophagen exprimieren den VPAC-2-Rezeptor (Burian et al. 2010).

In Gewebeschnitten des **Pankreas** signalisierte der Anti-VPAC-2-Antikörper eine Immunfärbung der apikalen exokrinen Azinuszellen, wohingegen die Inseln komplett negativ

waren. Dieses Ergebnis entspricht jedoch nicht den Funden von Ahrén, der den VPAC-2-Rezeptor in den humanen  $\beta$ -Zellen der Langerhans-Inseln beschreibt, wo sie funktionell die Insulin- und Glukagon-Ausschüttung stimulieren (Ahrén 2008).

Schließlich detektierte der Anti-VPAC-2-Antikörper sein Antigen in den Follikelepithelzellen der **Schilddrüse**, wo der VPAC-2-Rezeptor durch eine schwache, aber dennoch membranständige und spezifische Immunfärbung nachgewiesen werden konnte. Wie beim VPAC-1-, gibt es auch für den VPAC-2-Rezeptor in der derzeitigen Literatur noch keine Daten zur Expression in der humanen Schilddrüse.

Nur unspezifische Färbungen ergaben in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen des **Cortex**, der **Hypophyse**, des **Rückenmarks**, der **Spinalganglien** und der **Gallenblase**. Es war weder ein definierter Zellbezug noch eine spezifische Membranständigkeit zu erkennen. Auch in der Literatur lassen sich kaum Anhaltspunkte für eine Expression des VPAC-2-Rezeptors in diesen humanen Organen finden. Basille und Kollegen berichten, dass trotz einer hohen VPAC-1-Dichte sich kaum VPAC-2-Rezeptoren im humanen Kleinhirn-Cortex detektieren lassen (Basille et al. 2006). Einzig wird der VPAC-2-Rezeptor von Astrozyten im humanen ZNS (Masmoudi-Kouki et al. 2007) und in hoher Dichte von Neuronen im Nucleus suprachiasmaticus im Hypothalamus exprimiert. Dort ist er funktionell wichtig für eine korrekte Zellkommunikation des zirkadianen Schrittmachers und ist somit auch verantwortlich für den Metabolismus, für unterschiedliche neuroendokrine Funktionen und für die Lokomotorik (Vosko et al. 2007).

Bei den immunhistochemischen Untersuchungen des VPAC-2-Rezeptors sind stets auch Immunfärbungen der glatten Muskulatur, der Blutgefäße und lymphozytärer Ansammlungen aufgefallen, die ebenso von anderen Autoren beschrieben werden (Busto et al. 1999, Busto et al. 2000, Groneberg et al. 2006, Kato et al. 2012, Schulz et al. 2004, Tannu et al. 2010).

Humane **Herz**-Präparate blieben in den Untersuchungen mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper ungefärbt. Dies entspricht nicht dem Fund eines Autoren-Teams, welches den VPAC-2-Rezeptor in den humanen kardialen Trabekeln des rechten Atriums und des linken Ventrikels nachweisen konnte (Saetrum Opgaard et al. 2001).

Auch das den untersuchten Phäochromozytomen angrenzende normale **Nebennierengewebe** war VPAC-2-negativ. Mazzocchi und Kollegen detektierten den VPAC-2-Rezeptor jedoch sowohl in der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde als auch im Nebennierenmark (Mazzocchi et al. 2002).

Die analysierten **Mamma**-Präparate blieben gleichfalls ungefärbt. Auch dies widerspricht der aktuellen Datenlage, in der von VPAC-2-Rezeptoren im humanen Mamma-Gewebe berichtet wird (García-Fernández et al. 2005, Valdehita et al. 2010).

Zu humanen **Zervix**-Gewebeschnitten liegen keine Arbeiten anderer Autoren vor. In den Untersuchungen mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper blieben diese Proben ebenfalls ungefärbt. Einzig in den Follikeln des humanen Ovars wurden VPAC-2-Rezeptoren nachgewiesen (Bajo et al. 2000, Morelli et al. 2008). Dieses wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

Humane **Uterus**-Präparate erwiesen sich in dieser Arbeit als VPAC-2-negativ. Bajo und Kollegen detektierten den VPAC-2-Rezeptor aber auch im Uterus (Bajo et al. 2000).

Auch das untersuchte **Prostata**-Gewebe war in den immunhistochemischen Färbungen mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper negativ. Dem widersprechen die Befunde einiger Autoren, die den VPAC-2-Rezeptor auch in der humanen Prostata nachweisen konnten (Collado et al. 2004, García-Fernández et al. 2003).

Die hier beobachteten Diskrepanzen zwischen den Befunden der vorliegenden Arbeit und denen anderer Arbeitsgruppen könnten darin begründet sein, dass die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen bislang meist mit polyklonalen Antikörpern durchgeführt worden waren, während hier erstmalig ein monoklonaler Antikörper zum Einsatz kam, der möglicherweise weniger unspezifische Färbungen aufweist.

#### **6.4 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben**

Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass die VPAC-Rezeptoren VPAC-1 und VPAC-2 in vielen Tumoren überexprimiert werden (Schulz et al. 2004). Auf dem Boden dieser Tatsache wurde VIP bereits 1994 als Zielmolekül in der Tumorsuche etabliert und wird seitdem intensiv in der Tumorforschung untersucht (Bhargava et al. 2002). So hat VIP über die VPAC-Rezeptoren viele Effekte auf neoplastische humane Gewebe. In vielen Tumoren, wie z.B. in Lungen-, Mamma- und Prostata-Karzinomen induziert es einen EGFR- oder VEGF-Anstieg mittels des VPAC-1-Rezeptors und bewirkt als trophischer Faktor, der Tumorzellen vor der Apoptose schützt oder über den VPAC-1 ihre neuroendokrine Differenzierung induziert, ein Tumorzellwachstum (Collado et al. 2004, Gutiérrez-Cañas et al. 2005, Valdehita et al. 2007, Valdehita et al. 2009). In anderen Tumorentitäten, wie z.B. in Bronchial-Karzinomen und in klarzelligem Nierenzell-Karzinomen hat das Neuropeptid aber auch ein wachstumshemmendes oder die Metastasierung eindämmendes Potential (Busto et al. 2003, Vacas et al. 2013). Aufgrund dieser für das Tumorwachstum entscheidender



Wirkungen ist es wichtig, die VPAC-Rezeptoren in den verschiedenen Tumorentitäten zu charakterisieren und ein verlässliches Rezeptor-Expressionsprofil zu erstellen, auf welches in der Diagnostik und der Therapie von Tumoren zurückgegriffen werden kann. Auch ist es von Bedeutung, welche Tumorentität eher den VPAC-1- oder den VPAC-2-Rezeptor exprimiert, da hier zum einen große Unterschiede im Expressionsmuster dieser beiden Rezeptoren in den unterschiedlichen Tumoren vorliegen und zum anderen, wie bereits weiter oben erwähnt, mehrere Effekte von VIP über den VPAC-1-Rezeptor vermittelt werden (Dickson und Finlayson 2009, Reubi und Waser 2003). Möglichkeiten der Rezeptorsuche im Tumorgewebe sind die in vivo- und in vitro-Radiographie sowie die Immunhistochemie (Reubi und Waser 2003, Schulz et al. 2004). Hierbei ist die immunhistochemische Untersuchung von klarem Vorteil, da sie relativ schnell und unkompliziert zu bewerkstelligen ist und dabei trotzdem verlässlich eine Rezeptor-Überexpression aufzeigt (Schulz et al. 2004). Nichtsdestotrotz hängt der Erfolg dieser Methode stark von der Qualität der verwendeten Antikörper ab; gute monoklonale und polyklonale Anti-VPAC-Antikörper waren nur beschränkt verfügbar (Schulz et al. 2014). Mit den neuen monoklonalen humanen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörpern ist es nun erstmals möglich, die Membranständigkeit der Rezeptoren darzustellen und somit ein für histopathologische Routine-Untersuchungen zuverlässiges VPAC-1- und VPAC-2-Rezeptorprofil für humane Tumorgewebe aufzuzeigen. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Präparate wurde deswegen vor allem auf die Membranständigkeit als Zeichen der Spezifität geachtet. Da die bisherigen polyklonalen Antikörper nur zytoplasmatisch färbten, wodurch eine Abgrenzung gegenüber unspezifischen Färbungen erschwert wird, werden dadurch unter Umständen mehr positive Färbungen gesehen, als dies mit monoklonalen Antikörpern der Fall ist. So war dann auch erkennbar, dass, insbesondere beim VPAC-2, deutlich weniger Gewebe positiv gefärbt waren, als es die Literatur vorgibt.

Das in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf eine VPAC-1-Expression untersuchte **Glioblastom** war negativ, während von den zwei hinsichtlich einer VPAC-2-Expression untersuchten Präparaten eines geringgradig positiv war. In der gegenwärtigen Literatur gibt es Hinweise darauf, dass sowohl der VPAC-1-Rezeptor (Schulz et al. 2004) als auch der VPAC-2-Rezeptor (Kaisler 2008, Schulz et al. 2004) in Glioblastomen exprimiert werden; in den durchgeführten Untersuchungen von Schulz und Kollegen wiesen sogar alle Präparate sowohl den VPAC-1- als auch den VPAC-2-Rezeptor auf. Da es sich in der vorliegenden Untersuchung jedoch nur um eines bzw. zwei Präparate handelte, sollten, um eine eindeutige

Aussage zum Rezeptorbesatz von Glioblastomen treffen zu können, weitere Analysen mit einer höheren Zahl an Präparaten folgen.

Knapp 60 % der gefärbten GH-produzierenden **Hypophysenadenome** waren entweder VPAC-1- oder VPAC-2-positiv. Nach der gegenwärtigen Datenlage konnte bisher nur eine VPAC-1-Expression in dieser Tumorentität nachgewiesen werden (Kaisler 2008, Schulz et al. 2004). Schulz und Kollegen verwendeten aber auch hier wieder nur eine sehr geringe Anzahl von n = 4 Präparaten, die sich in zwei GH-produzierende und zwei nicht funktionelle Hypophysenadenome aufgliederten, was für eine signifikante Aussage zu gering ist. Interessant wäre es zu erfahren, wie sich die Expression der VPAC-Rezeptoren in Hypophysenadenomen verhält, die andere Hormone, außer dem GH produzieren. Hier ist insbesondere das Prolaktin-produzierende Prolaktinom zu erwähnen, da aus der Literatur bereits bekannt ist, dass VIP den peripheren Prolaktin-Spiegel signifikant erhöht (Fahrenkrug und Emson 1982). Weitere Untersuchungen zu dieser Tumorentität sind auf jeden Fall empfehlenswert.

Alle untersuchten **Schilddrüsen-Karzinome** enthielten entweder den VPAC-1- und/ oder den VPAC-2-Rezeptor. Wie schon bei den immunhistochemischen Untersuchungen an den normalen Humangeweben erwähnt, ist auch bei den Tumorgeweben der Schilddrüse die Datenlage sehr dünn. Einzig Moody und Kollegen berichten von einer Expression des VPAC-1-Rezeptors in dieser Tumorart (Moody et al. 2003). Schulz und Kollegen konnten sogar in keinem der von ihnen untersuchten Schilddrüsen-Karzinome einen der beiden VPAC-Rezeptoren nachweisen (Schulz et al. 2004). Dies kann am ehesten darauf zurückgeführt werden, dass diese Autoren lediglich einen polyklonalen Antikörper verwendet hatten, mit möglicherweise geringer Spezifität, aber auch darauf, dass nur eine sehr geringe Anzahl von Tumorpräparaten untersucht worden ist. Es sollten daher mit den monoklonalen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörpern weiterführende Analysen an dieser Tumorentität mit einer größeren Fallzahl unternommen werden.

Weiterhin waren 50 % aller auf den VPAC-1- und knapp 70 % aller auf den VPAC-2-Rezeptor hin untersuchten **mikronodulären Thymome** immungefärbt. Das Immunsignal wurde jedoch oft durch ebenfalls positive Lymphozyten überlagert. In der Literatur lassen sich bislang keine Untersuchungen zur VPAC-Rezeptor-Expression in Thymomen finden.

Verschiedene **Lungen-Karzinome** wurden jeweils mit dem Anti-VPAC-1- und dem Anti-VPAC-2-Antikörper analysiert. Hierbei waren etwa 70 % VPAC-1- und 25 % VPAC-2-positiv. Die berechneten IRS-Werte waren allerdings oftmals niedrig und erreichten für den VPAC-1-Rezeptor maximal einen Wert von 9 (Mittelwert 3,9) und für den VPAC-2-Rezeptor

einen maximalen Wert von 6 (Mittelwert 3,0). Im Einzelnen waren kleinzellige Bronchial-Karzinome sehr häufig immungefärbt, zu 80 % enthielten diese den VPAC-1- und zu 60 % den VPAC-2-Rezeptor. Dies wird auch durch die Literatur so bestätigt. Mehrere Autoren, die eine Unterscheidung zwischen kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinomen vorgenommen hatten, fanden in ihren Analysen entweder nur den VPAC-2- in kleinzelligen Bronchial-Karzinomen (Moody et al. 2003) oder sowohl den VPAC-1- als auch den VPAC-2-Rezeptor in kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinomen (Busto et al. 1999, Busto et al. 2003, Kaisler 2008). Dagegen waren die hier untersuchten nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinome (Adeno- und Plattenepithel-Karzinome) alle VPAC-2-negativ, was sich durch die Literatur nicht bestätigen lässt. Mehrere Forschergruppen fanden den VPAC-2-Rezeptor in dieser Tumorgruppe, ohne diese weiter in Adeno- und Plattenepithel-Karzinome zu differenzieren (Busto et al. 1999, Busto et al. 2003, Kaisler 2008). Auch wäre eine solche Differenzierung interessant gewesen, da sich in dieser Arbeit die VPAC-1-Expression zwischen Adeno- (80 % VPAC-1-positiv) und Plattenepithel-Karzinomen (nur ein Drittel VPAC-1-positiv) deutlich unterscheidet. In der Literatur wird verallgemeinernd von einer VPAC-1-Expression in nicht-kleinzelligen Bronchial-Karzinomen berichtet (Busto et al. 1999, Busto et al. 2003, Kaisler 2008). Die Mehrzahl der Autoren-Teams spricht jedoch noch allgemeiner nur von Lungen-Karzinomen und beschreibt dort den VPAC-1-Rezeptor (Bhargava et al. 2002, Dickson und Finlayson 2009, Moody et al. 2002, Moody et al. 2003, Moody und Gozes 2007, Zhang et al. 2007). Somit lässt sich die im Eingang geschilderte Dominanz des VPAC-1-Rezeptors in Lungen-Karzinomen klar bestätigen, woraus sich schließen lässt, dass dieser Rezeptor bei Lungentumoren eine sowohl notwendige als auch sinnvolle Diagnostik- und Therapieoption darstellt.

Nahezu alle untersuchten **Tumore des Magen-Darm-Traktes** waren entweder VPAC-1- und/oder VPAC-2-positiv. Dies konnten auch mehrere andere Autoren in ihren Analysen zeigen. Dickson und Finlayson schreiben sehr allgemein, dass der VPAC-1-Rezeptor in Karzinomen des Gastrointestinal-Traktes exprimiert wird (Dickson und Finlayson 2009). Fast immer enthalten entdifferenzierte Zellen in Magen-Karzinomen den VPAC-1-Rezeptor, dies legen die Ergebnisse dieser Arbeit und die Analysen anderer Autoren nahe (Kaisler 2008, Moody et al. 2003, Schulz et al. 2004, Zhang et al. 2007). Der VPAC-2-Rezeptor, der in der vorliegenden Arbeit ebenso häufig in Magen-Karzinomen aufgefunden wurde, wird hingegen von weniger Autoren für diese Tumorentität beschrieben (Schulz et al. 2004). Schulz und Kollegen haben sogar dahingehend differenziert, dass die VPAC-1- und die VPAC-2-Rezeptoren schwächer in diffusen und stärker in intestinalen Magen-Karzinomen exprimiert

werden (Schulz et al. 2004). Dies lässt sich an den Ergebnissen dieser Arbeit klar bestätigen, denn obwohl nahezu alle diffusen und intestinalen Magen-Karzinome VPAC-1- und/oder VPAC-2-positiv waren, wurde an den IRS-Werten deutlich, dass das diffuse stets schwächer immungefärbt ist als das intestinale Magen-Karzinom. So lagen die IRS-Mittelwerte beim diffusen Magen-Karzinom für den VPAC-1 bei 1,3 bzw. für den VPAC-2 bei 1,0, wohingegen die entsprechenden Werte für das intestinale Magen-Karzinom bei 6,6 bzw. bei 4,0 lagen. Ähnliches war bei den gefärbten gastrointestinalen Stromatumoren (GIST) zu beobachten. In der Literatur wird beschrieben, dass in dieser Tumorentität nur der VPAC-2-Rezeptor exprimiert wird und der VPAC-1-Rezeptor lediglich selten oder schwach vertreten ist (Harmar et al. 2012, Reubi et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit konnte der VPAC-1-Rezeptor zwar in allen vier untersuchten GISTs nachgewiesen werden, die Expressionsintensität ist jedoch mit einem maximalen IRS-Wert von 1 zu vernachlässigen. Auch mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper, konnten alle vier Tumor-Präparate immungefärbt werden. Hier zeigte sich allerdings ein maximaler IRS-Wert von 3, der zwar ebenfalls nicht sehr hoch ist, jedoch die höhere Relevanz des VPAC-2- gegenüber dem VPAC-1-Rezeptor in dieser Tumorentität verdeutlicht. Im Gegensatz dazu deuten mehrere Arbeiten darauf hin, dass in Kolon-Karzinomen, die hier nicht untersucht wurden, der VPAC-1-, aber nicht der VPAC-2-Rezeptor exprimiert wird (Kaisler 2008, Moody et al. 2003, Schulz et al. 2004, Zhang et al. 2007).

Weiterhin waren alle auf den VPAC-1 und 40 % der auf den VPAC-2 hin untersuchten **Pankreas-Karzinome** immungefärbt. Dies lässt sich durch verschiedene Analysen anderer Autoren teilweise bestätigen, in denen nur der VPAC-1-Rezeptor in dieser Tumorart aufgefunden wurde, nicht aber der VPAC-2-Rezeptor (Dickson und Finlayson 2009, Kaisler 2008, Moody et al. 2002, Schulz et al. 2004, Zhang et al. 2007, Zia et al. 2000).

Zwei Drittel der untersuchten **Phäochromozytome** wies, wenn auch nicht intensiv gefärbt, den VPAC-1-Rezeptor auf, wohingegen alle Präparate dieser Entität VPAC-2-negativ waren. Nur wenige Arbeiten sind zur VPAC-Expression in dieser Tumorart zu finden. Schulz und Kollegen konnten jedoch nur eine VPAC-2- und keine VPAC-1-Expression nachweisen (Schulz et al. 2004). Im Gegensatz dazu berichtet wiederum Kaisler nur über ein Vorhandensein lediglich des VPAC-1-Rezeptors in dieser Entität (Kaisler 2008). Womöglich hält sich die Relevanz der VPAC-Rezeptoren in Phäochromozytomen aber auch in Grenzen, da in der Literatur auch beschrieben ist, dass hauptsächlich der PAC-1-Rezeptor in diesen stark vertreten ist (Dickson und Finlayson 2009).

Zahlreiche **neuroendokrine Tumore (NET)** wurden für die vorliegende Arbeit untersucht, darunter auch pankreatische neuroendokrine Tumore, Insulinome und Karzinoide. Etwa 80 % der analysierten NETs waren VPAC-1-positiv, jedoch enthielten nur knapp 45 % den VPAC-2-Rezeptor. Ähnliches wird auch in der Literatur beschrieben. Zum einen wurden beide VPAC-Rezeptor in NETs aufgefunden (Kaisler 2008, Schulz et al. 2004), zum anderen gibt es aber auch Hinweise darauf, dass nur der VPAC-1-Rezeptor in dieser Entität exprimiert wird, nicht aber der VPAC-2-Rezeptor (Reubi und Waser 2003).

Eine Tumorentität mit einer großen Vielfalt ist die der **Sarkome**. Knapp 60 % der hier untersuchten Sarkome war VPAC-1-positiv und etwa die Hälfte enthielt den VPAC-2-Rezeptor. Innerhalb der verschiedenen Typen der Sarkome gab es in der VPAC-Expression jedoch gravierende Unterschiede (siehe Kapitel 5.3.2 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tumorgeweben). Daten zu den VPAC-Rezeptoren in Sarkomen gibt es wenige. Leiomyosarkome des Magens scheinen den VPAC-2-Rezeptor zu exprimieren (Moody et al. 2003). Dies widerspricht jedoch den Ergebnissen dieser Arbeit, in der die Hälfte der analysierten Leiomyosarkome zwar VPAC-1-positiv war, jedoch keines der Sarkome dieser Entität den VPAC-2 exprimierte. Weitere Untersuchungen anderer Autoren beschränken sich auf das benigne Pendant dieses glattmuskulären Sarkoms, das Leiomyom. Dieses enthält wohl hauptsächlich den VPAC-2-Rezeptor (Bajo et al. 2000, Dickson und Finlayson 2009, Harmar et al. 2012, Kaisler 2008), offensichtlich aber auch den VPAC-1-Rezeptor (Bajo et al. 2000). Interessanter wären Daten über das VPAC-Expressionsprofil in Angio- und Osteosarkomen, die in dieser Arbeit alle VPAC-1- und/ oder VPAC-2-positiv waren. So ist auch bereits bekannt, dass Blutgefäßwände die VPAC-Rezeptoren exprimieren (Groneberg et al. 2006, Schulz et al. 2004) und VIP maßgeblich in den Knochenstoffwechsel eingreift (Persson und Lerner 2011). Weitere Analysen mithilfe spezifischer monoklonaler Antikörper sollten hier in einem größeren Spektrum an Sarkom-Entitäten und mit einer größeren Fallzahl an Präparaten unbedingt folgen.

Auch zu **Hämangiomen**, die in den vorliegenden Untersuchungen alle stark VPAC-1- und VPAC-2-immungefärbt waren, existieren derzeit noch keine Daten. Aus oben beschriebenen Gründen wären weitere Untersuchungen jedoch sehr aufschlussreich.

Die hier untersuchten **Prostata-Karzinome** waren zu etwa 45 % VPAC-1- und zu einem Viertel VPAC-2-positiv. Auch hier ist die Datenlage widersprüchlich, mehrere Autoren konnten nur den VPAC-1-Rezeptor in dieser Entität nachweisen (Bhargava et al. 2002, Gutiérrez-Canas et al. 2005, Kaisler 2008, Moody et al. 2003, Zhang et al. 2007). Andere

Arbeiten wiederum beschreiben beide VPAC-Rezeptoren in Prostata-Karzinomen (Fernández-Martínez et al. 2012, García-Fernández et al. 2003, Schulz et al. 2004).

Etwa 70 % der untersuchten **Harnblasen-Karzinome** enthielten den VPAC-1- und knapp 45 % den VPAC-2-Rezeptor. Andere Autoren beschränkten sich allerdings ausschließlich auf die Beschreibung einer VPAC-1-Expression in dieser Tumorentität, der VPAC-2-Rezeptor wird dabei nicht erwähnt (Bhargava et al. 2002, Kaisler 2008, Moody et al. 2003, Zhang et al. 2007).

Von den untersuchten **Mamma-Karzinomen** waren etwa 70 % VPAC-1- und 75 % VPAC-2-positiv. Die Anzahl der veröffentlichten Befunde zu dieser wichtigen Tumorart der Frau ist sehr groß, teilweise aber auch widersprüchlich. Hauptgrund hierfür sind wohl die qualitativ unterschiedlich guten polyklonalen Antikörper, die für die Analysen verwendet wurden. So berichten zahlreiche Autoren, dass im Mamma-Karzinom ausschließlich der VPAC-1- und nicht der VPAC-2-Rezeptor exprimiert wird (Bhargava et al. 2002, Dickson und Finlayson 2009, Kaisler 2008, Moody et al. 2002, Moody et al. 2003, Moody und Gozes 2007, Reubi et al. 2002, Valdehita et al. 2007, Valdehita et al. 2009, Valdehita et al. 2012, Zhang et al. 2007). Andere Autoren fanden wiederum beide VPAC-Rezeptoren in dieser Entität (García-Fernández et al. 2005, Schulz et al. 2004) und stellen die VPAC-1-Expressionsdichte über die des VPAC-2-Rezeptors (Valdehita et al. 2010). Insgesamt sollten aufgrund der Relevanz dieser Tumorentität für die Frau weitere Untersuchungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern erfolgen.

Ein weiterer relevanter Tumor der Frau ist das **Ovarial-Karzinom**. In den vorliegenden Untersuchungen wurde nahezu immer der VPAC-1-Rezeptor detektiert, aber in nur der Hälfte der Fälle der VPAC-2. Leider existieren nur wenige Daten zu dieser Tumorentität, in der zumeist der VPAC-1-Rezeptor nachgewiesen werden konnte (Kaisler 2008, Schulz et al. 2004), in schwacher Färbung aber auch der VPAC-2-Rezeptor gefunden wurde (Schulz et al. 2004). Auch hier sollten weitere Untersuchungen folgen, da bereits bekannt ist, dass Follikel des humanen Ovars den VPAC1- und den VPAC-2-Rezeptor exprimieren (Bajo et al. 2000, Morelli et al. 2008). Die Rezeptoren könnten somit auch bei der Entdifferenzierung dieses Gewebes relevant sein.

Ähnlich sah das Expressionsprofil bei den untersuchten **Cervix-Karzinomen** aus. Alle Präparate waren VPAC-1-, etwa 60 % VPAC-2-positiv. Allerdings existieren entsprechende Untersuchungen bisher noch nicht. Es lassen sich lediglich Daten zu einer VPAC-1-Expression im Uterus-Karzinom, was hier nicht untersucht wurde, auffinden (Moody et al.

2003). Weitere Analysen zu dieser Tumorentität sollten mit monoklonalen Antikörpern unbedingt erfolgen, insbesondere im Hinblick auf eine Expression des VPAC-1-Rezeptors. Das untersuchte **Endometriose**-Präparat blieb sowohl mit dem Anti-VPAC-1- als auch mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper ungefärbt. In der Literatur finden sich bislang keine Untersuchungen, in denen eine VPAC-Expression bei der Endometriose analysiert wurde. Auch hier sind weiterführende Untersuchungen mit einer größeren Fallzahl für eine endgültige Aussage zur VPAC-Rezeptor-Expression notwendig.

## **6.5 Immunhistochemische Untersuchungen an normalen Rattengeweben**

Obwohl die monoklonalen VPAC-1- und VPAC-2-Antikörper gegen die C-terminalen Sequenzen der humanen VPAC-1- und VPAC-2-Rezeptoren erzeugt worden sind, wurden sie auch für die immunhistochemischen Untersuchungen an normalen Rattengeweben verwendet, da vermutet werden konnte, dass aufgrund der Ähnlichkeit der carboxyterminalen Sequenzen der VPAC-Rezeptoren von Mensch und Ratte Kreuzreaktionen auftreten. So unterscheiden sich die entsprechenden Sequenzen in nur einer Aminosäure beim VPAC-1 bzw. in nur drei Aminosäuren beim VPAC-2 (siehe Kapitel 4.1.2.1 Antikörper). Doch obwohl die carboxyterminalen Sequenzen beider VPAC-Rezeptoren von Maus sowie Ratte identisch sind und sich die humanen Sequenzen davon nur geringfügig unterscheiden, sollte man keinesfalls die immunhistochemischen Ergebnisse der drei Spezies miteinander vermischen. Sequenzunabhängig bestehen weiterhin Spezies-spezifische Unterschiede in der VPAC-Expression in Maus-, Ratten- und Humangewebe, die man unbedingt beachten sollte (Harmar et al. 2004). Eine zusätzliche Eignung der Antikörper für den Rezeptornachweis bei der Ratte oder, wie in den Western-Blot-Analysen gezeigt, bei der Maus erweitert außerdem die Einsatzfähigkeit der Antikörper, da viele Untersuchungen der Grundlagenforschung an diesen beiden Tierspezies erfolgen. Diese Abweichungen sind zwar nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit, sollten aber bedacht und weiterführend untersucht werden. Exemplarisch werden die hier analysierten Rattengewebe den Ergebnissen gegenübergestellt, die in der Literatur sowohl mit Ratten- als auch mit Mausgewebe erarbeitet worden sind.

Der **VPAC-1**-Rezeptor wurde, wie erwartet, im **Darmgewebe** detektiert. Dort waren, ähnlich wie im normalen Humangewebe, Drüsen, Lieberkühn-Darmkrypten, Becherzellen, Darmzotten und einzelne Zellen des gastroenteropankreatischen Systems intensiv immungefärbt. Ein ähnliches Ergebnis konnte auch von mehreren anderen Autoren erhoben werden, wobei meist jedoch keine genaue Lokalisation im Darmgewebe beschrieben wurde

(Juarranz et al. 1999, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Eine VPAC-1-Rezeptor-Expression scheint es zudem anderen Studien an Rattengeweben zufolge auch in der zirkulären Muskelschicht des Kolons zu geben (Shi und Sarna 2008). Auch bei der Maus konnte eine VPAC-1-Expression der Mukosa des Gastrointestinal-Traktes nachgewiesen werden (Harmar et al. 2004, Karacay et al. 2001, Moody et al. 2003).

In der vorliegenden Untersuchung detektierte der Anti-VPAC-1-Antikörper weiterhin sein Antigen in den Langerhans-Inseln des endokrinen **Pankreas**. Schwach immungefärbt waren in diesem Gewebe auch exokrine Azinuszellen, wohingegen im hier untersuchten Humangewebe das exokrine Pankreas im Vordergrund stand. Jamen und Kollegen untersuchten ebenfalls Rattengewebe und konnten den VPAC-1-Rezeptor in den Langerhans-Inseln nachweisen (Jamen et al. 2002). Andere Autoren wiederum beschreiben allerdings nur die Blutgefäße um die endokrinen Inseln herum als VPAC-1-positiv (Ahrén 2008, Juarranz et al. 1999, Winzell und Ahrén 2007) oder geben keine genaue Lokalisation an (Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009).

Weiterhin wurden mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper Gewebeschnitte des **Gehirns** analysiert. Hierbei waren verschiedene Strukturen membranständig und spezifisch immungefärbt, darunter der ventrikuläre Plexus choroideus und die Pyramidenzellen der Großhirnrinde, die auch im Humangewebe den VPAC-1 enthielten. Desweiteren waren die zerebellaren Purkinjezellen sowie einzelne hormonsezernierende Zellen der Hypophyse vordergründig gefärbt. Weiterhin wiesen Nervenzellperikarya der untersuchten **Spinalganglion**-Schnitte und Nervenzellkörper der grauen Substanz des **Rückenmarks** den VPAC-1-Rezeptor auf. Humane Spinalganglion- und Rückenmark-Präparate waren hingegen VPAC-1-negativ. Verschiedene Autoren hatten ebenfalls das ZNS hinsichtlich einer Expression des VPAC-1-Rezeptors mit teils ähnlichen, teils aber auch abweichenden Ergebnissen untersucht. So konnte der VPAC-1 in mehreren Regionen des ZNS lokalisiert werden, darunter in der inneren und äußeren Granulosa-Zellschicht des Kleinhirnkortex, wo er an der neuronalen Entwicklung mitwirkt und funktionell neuroprotektiv ist (Botia et al. 2007). Auch Astrozyten (Dickson und Finlayson 2009, Masmoudi-Kouki et al. 2007) sowie Nervenzellen des Ganglion sphenopalatinum (Csati et al. 2012) sind demnach VPAC-1-positiv. Mehrere Autoren bestätigen auch die Existenz des VPAC-1-Rezeptors in der Hypophyse (Dickson und Finlayson 2009) bzw. in der Adenohypophyse (Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Während einige Autoren nur sehr allgemein das Gehirn als Expressionsort anführen (Dickson und Finlayson 2009) oder lediglich das murine Frontal- und Kleinhirn aufzählen (Karacay et al. 2001), nennen andere Autoren exakte Lokalisationen des VPAC-1 im ZNS der Maus oder



der Ratte, so die Amygdala, den Bulbus olfactorius, den zerebralen Cortex, den Gyrus dentatus des Hippocampus und die Epiphyse (Hill et al. 2007, Moody et al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009).

In den hier gefärbten **Magen**-Schnitten waren die Tunica Submucosa und die Tunica Muscularis sowie die darin enthaltene glatte Muskulatur und die Blutgefäße, wie auch im humanen Magengewebe beobachtet, VPAC-1-positiv. So berichten auch verschiedene Autoren, dass der VPAC-1-Rezeptor in den Blutgefäßen der meisten Organe aufzufinden ist (Baun et al. 2011, Busto et al. 2000, Vaccari et al. 2006). Außerdem gibt es in der Literatur Berichte bezüglich einer Expression des VPAC-1-Rezeptors in der Mucosa des Gastrointestinal-Traktes der Maus (Harmar et al. 2004). Harmar und Kollegen fanden den VPAC-1 weiterhin in den D-Zellen von Rattenmägen (Harmar et al. 2012).

Im männlichen Reproduktionstrakt der Ratte war ebenso wie beim Magen die Tunica Muscularis der **Samenblase** stark immungefärbt. Auch das Zylinderepithel der Ductuli efferentes testis und die Spermatozytenköpfe im **Nebenhoden** reagierten positiv auf den Anti-VPAC-1-Antikörper. Schwächer, jedoch trotzdem spezifisch gefärbt waren Myofibroblasten des **Hodens**. Wenig ist darüber in der gegenwärtigen Literatur zu finden. Mehrere Autoren lokalisieren den VPAC-1-Rezeptor zwar im Hoden von Maus und Ratte, jedoch ohne einen konkreten Expressionsort anzuführen (Karacay et al. 2001, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Juarranz und Kollegen berichten von VPAC-1-positiven Hodensepten (Juarranz et al. 1999), wohingegen bei den Untersuchungen von Harmar und Kollegen an Mäusen die Leydig-Zellen des Hodens VPAC-1-positiv waren (Harmar et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit sind Prostata-Schnitte der Ratte zwar nicht untersucht worden, allerdings wird durch mehrere Analysen verschiedener Autoren bestätigt, dass dieses Organ bei Ratten funktionell aktive VPAC-1-Rezeptoren besitzt (Gutiérrez-Canas et al. 2005, Harmar et al. 2004, Juarranz et al. 1999).

In den untersuchten **Parotis**-Präparaten erwiesen sich seröse Azini und in den Schnitten der extraorbitalen **Tränendrüsen** seröses Drüsengewebe als VPAC-1-positiv. In der Literatur sind derzeit keine Studien zur VPAC-Expression in der Parotis oder in der Tränendrüse aufzufinden.

Eine schwache, jedoch spezifische Immunfärbung durch den Anti-VPAC-1-Antikörper zeigte sich in einzelnen Schichten der **Retina**. Hierzu ähnliche Ergebnisse sind einzig bei Vaudry und Kollegen aufzufinden, die allerdings keine genauere Lokalisation des VPAC-1-Rezeptors in der Retina beschreiben (Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009).

Eine sehr schwache Immunfärbung ließ sich bei einzelnen Lymphozyten der **Milz** beobachten, wohingegen die B-Lymphozyten der humanen Milz eine intensive Färbung aufwiesen. Gleichartig sind auch die Ergebnisse der Analysen anderer Autoren. Diese hatten zwar Maus- und nicht Rattengewebe untersucht, konnten jedoch auch nur eine schwache Expression des VPAC-1-Rezeptors in der Milz nachweisen (Karacay et al. 2001). Andere präzisieren ihre Befunde auf CD4-T-Zellen (Valdehita et al. 2010, Voice et al. 2004) und auf die weiße Pulpa der Milz (Harmar et al. 2004).

In den untersuchten **Lungengewebe**-Schnitten war die beobachtete Immunfärbung zwar sehr schwach ausgeprägt, es konnten jedoch deutlich spezifische und membranständige Strukturen ausgemacht werden. Hierzu gehörten zum einen das alveoläre Bindegewebsstroma und zum anderen organspezifische Makrophagen der Lunge. Aufgrund der hohen Relevanz des VPAC-1-Rezeptors in der Lunge gibt es zahlreiche Untersuchungen an Ratte und Maus zu diesem Gewebe. So konnten mehrere Autoren nachweisen, dass der VPAC-1-Rezeptor auf Makrophagen der Lunge bzw. allgemein auf Makrophagen zu detektieren ist (Busto et al. 2000, Harfi et al. 2004, Shreeve et al. 2000, Yadav und Goetzl 2008). Auch gibt es Berichte in der Literatur, dass der VPAC-1-Rezeptor allgemein im Lungengewebe lokalisiert ist (Busto et al. 1999, Busto et al. 2000, Dickson und Finlayson 2009, Karacay et al. 2001, Moody et al. 2003, Tannu et al. 2010, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Einige wenige Autoren schreiben konkret, dass der VPAC-1-Rezeptor im Lungen-Epithel sowie in den glatten Muskelzellen alveolärer Blutgefäße exprimiert wird (Busto et al. 2000, Juarranz et al. 1999).

Eine ebenfalls sehr schwache Immunfärbung ließ sich bei den Präparaten der **Speicheldrüse** feststellen. Hier waren einzelne exokrine Azini VPAC-1-positiv, was sich jedoch aufgrund der fehlenden Literatur zu diesem Gewebe nicht weiter belegen lässt.

In den untersuchten **Herz**-Schnitten waren die Herzmuskelzellen zwar schwach immungefärbt, dieses Immunsignal war jedoch wie im Humangewebe unspezifisch, da meist nicht membranständig. Auch hier hält sich die Datenlage in Grenzen. Einige wenige Autoren konnten eine schwache Färbung in Herz-Präparaten der Maus (Karacay et al. 2001) bzw. in den kardialen Myozyten der Ratte beobachten (Baron et al. 2001). Hierbei könnte es sich aber auch um unspezifische Färbungen gehandelt haben, da polyklonale Antikörper verwendet worden waren, die den monoklonalen in ihrer Spezifität unterlegen sind.

Ebenso wie beim Humangewebe ergaben die **Leber**-Präparate eine unspezifische Färbung. Mehrere Autoren fanden in ihren Analysen allerdings Hinweise auf eine Expression des VPAC-1-Rezeptors im Lebergewebe der Maus und der Ratte (Dickson und Finlayson 2009, Juarranz et al. 1999, Karacay et al. 2001, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Diese

Befunde sind möglicherweise, da mit polyklonalen Antikörpern erhoben, die keine membranständigen Färbungen aufzeigen können, ebenfalls unspezifisch.

Auch Präparate des **Ovars** waren zwar teilweise gefärbt, allerdings ohne eine Membranständigkeit zu zeigen. In der Literatur konnte in mehreren Untersuchungen an Maus- und Rattengewebe der VPAC-1-Rezeptor im Ovar nachgewiesen werden (Karacay et al. 2001, Ko und Park-Sarge 2000). Dennoch scheint dieser in einzelnen Follikeln, in Theca-Zellen, in den Blutgefäßwänden und im Follikelstroma lokalisiert zu sein (Gabbay-Benziv et al. 2012, Vaccari et al. 2006).

Weiterhin waren die hier vorliegenden Gewebeschnitte des **Uterus**, wie schon in den Humanpräparaten beobachtet, lediglich unspezifisch gefärbt. Insgesamt berichten lediglich zwei Forscherteams, die Ratten und Mäuse untersucht hatten, von einer Expression des VPAC-1-Rezeptors im Uterus bzw. in den glatten Muskelzellen dieses Gewebes (Hauk et al. 2014, Juarranz et al. 1999). Auch hier könnte es sich aufgrund der verwendeten polyklonalen Antikörper um unspezifische Färbungen gehandelt haben.

Die **Nieren**-Schnitte, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, waren (wie auch im Humangewebe) VPAC-1-negativ. So bleibt das Nierengewebe auch in der Literatur zu VPAC-1-Rezeptoren meist unberücksichtigt. Einige Forschergruppen konnten die Rattenniere und das Nierenepithel dennoch als VPAC-1-positiv identifizieren (Brubel et al. 2011, Juarranz et al. 1999, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Auch diese Ergebnisse sind möglicherweise aufgrund der eingesetzten polyklonalen Antikörper unspezifisch.

Auch das Nachbarorgan der Niere, die **Nebenniere**, enthielt unseren Untersuchungen zufolge keinen VPAC-1-Rezeptor. Eine Forschergruppe um Vaudry berichtete jedoch von einer VPAC-1-Rezeptor-Expression, die sowohl im Mark als auch in der Rinde der Nebenniere lokalisiert sein soll (Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Dagegen beschreibt eine andere Forschergruppe um Juarranz einzig das Nebennierenmark als VPAC-1-positiv (Juarranz et al. 1999), wohingegen Karacay und Kollegen sich gar nicht festlegen und die Nebenniere ohne genaue Lokalisation als Expressionsort benennen (Karacay et al. 2001). So ist festzuhalten, dass sich die einzelnen Analysen des Nebennierengewebes doch sehr widersprechen und weitere Untersuchungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern möglicherweise hier weiter Aufschluss bringen könnten.

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit zu den untersuchten **Thymus**-Präparaten, die hier VPAC-1-negativ waren, weisen eine Diskrepanz zu den Analysen anderer Autoren auf, die Thymusgewebe von der Maus und der Ratten analysiert hatten und mit polyklonalen Antikörpern den VPAC-1-Rezeptor dort detektierten konnten (Karacay et al. 2001, Moody et

al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Demnach soll er auf Thymozyten und im Thymusmark lokalisiert sein (Busto et al. 2000, Harmar et al. 2004).

Interessanterweise waren die mit dem Anti-VPAC-1-Antikörper gefärbten **Lymphknoten-**Schnitte der vorliegenden Arbeit VPAC-1-negativ, obwohl die Lymphozyten humaner Lymphknoten-Präparate immungefärbt waren. Zwar wird in der Literatur nicht direkt im Lymphknotengewebe nach dem VPAC-1-Rezeptor gesucht, jedoch ist er laut mehreren Autoren konstitutiv auf T-Lymphozyten der Maus und der Ratte lokalisiert (Busto et al. 2000, Dorsam et al. 2011, Harfi et al. 2004, Harmar et al. 2004, Harmar et al. 2012, Valdehita et al. 2010, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009, Voice et al. 2004, Vomhof-DeKrey und Dorsam 2008, Yadav und Goetzl 2008). Dies haben auch stets stark immungefärbte lymphozytäre Ansammlungen in verschiedenen Rattengeweben gezeigt. Weiterhin waren in den meisten der hier untersuchten Präparate auch Blutgefäße und glatte Muskelzellen stark VPAC-1-positiv, so wie es auch viele Autoren über Maus- und Rattengewebe berichten (Ahrén 2008, Baun et al. 2011, Busto et al. 2000, Juarranz et al. 1999, Shi und Sarna 2008, Vaccari et al. 2006, Winzell und Ahrén 2007).

Auch der **VPAC-2**-Rezeptor ließ sich in zahlreichen Rattengeweben lokalisieren. Eine intensive und membranständige Immunfärbung ließ sich hierbei in allen Schichten der **Retina** ausmachen. Diesen Befund konnten auch mehrere andere Autoren in ihren Analysen an Ratten- und Mausgeweben erheben, obwohl die genaue Lokalisation des Rezeptors unerwähnt blieb (Dickson und Finlayson 2009, Harmar et al. 2004, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009).

Weiterhin waren alle untersuchten Gewebe des **Magen-Darm-Traktes**, wie auch schon beim humanen Gastrointestinal-Trakt gesehen, stark VPAC-2-positiv. Insbesondere waren lymphozytäre Zellhaufen, das Drüsengewebe, Becherzellen, Zotten, Darmkrypten und endokrin-aktive Zellen sehr deutlich immungefärbt. Von ähnlichen Ergebnissen in Ratten- und Mausgeweben berichten auch viele Autoren in der Literatur. So ist der VPAC-2-Rezeptor im Epithel der Darm- und Magenmukosa (Dickson und Finlayson 2009, Juarranz et al. 1999) oder, wie eine andere Forschergruppe schreibt, im basalen Anteil des Mukosa-Epithels des Kolons der Maus (Harmar et al. 2004) lokalisiert. Andere Autorengruppen geben lediglich den Magen als Expressionsort an (Moody et al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Darüber hinaus wird der VPAC-2-Rezeptor auf der glatten Muskulatur des Gastrointestinal-Traktes exprimiert (Harmar et al. 2004, Juarranz et al. 1999, Kato et al. 2012, Mahavadi et al. 2013, Shi und Sarna 2008). Aufgrund der durch die Literatur bereits erwarteten VPAC-2-

Expression auf T-Lymphozyten und auf Makrophagen, sind entzündliche Vorgänge in den Geweben des Magen-Darm-Traktes, aber auch in den Präparaten anderer Organe, immunhistochemisch leicht zu detektieren. Mehrere Maus- und Rattenstudien zeigen allerdings, dass die VPAC-2-Rezeptordichte erst über einen inflammatorischen Stimulus bzw. die Stimulation des T-Zell-Rezeptors hochreguliert wird – im Gegensatz zum VPAC-1-Rezeptor, der konstitutiv auf diesen Zellen exprimiert wird (Busto et al. 2000, Harfi et al. 2004, Harmar et al. 2012, Shreeve et al. 2000, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009, Yadav und Goetzl 2008). Gericke und Kollegen konnten aber auch zeigen, dass auch murine Fibroblasten und Adipozyten den VPAC-2-Rezeptor tragen und somit leicht mit Lymphozyten oder anderen Zellen des Bindegewebsstromas verwechselt werden können (Gericke et al. 2009).

In den hier untersuchten Präparaten der **Parotis** und der **Glandula submandibularis** waren die Schaltstücke durch den Anti-VPAC-2-Antikörper stark immungefärbt. Ähnliche Analysen zum VPAC-2-Rezeptor in der Parotis und in der Glandula submandibularis sind in der Literatur derzeit nicht zu finden.

Die in den in dieser Arbeit untersuchten **Leber**-Präparaten enthaltenden Kupffer-Zellen, die organspezifische Makrophagen darstellen, waren mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper wie schon im Humangewebe sehr spezifisch immungefärbt. Nur wenige Autorengruppen beschreiben das Lebergewebe als spezifischen Expressionsort des VPAC-2-Rezeptors (Dickson und Finlayson 2009, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009), Kupffer-Zellen bleiben dabei unerwähnt. Wie jedoch weiter oben schon beschrieben, wird angenommen, dass Makrophagen aller Organe den VPAC-2-Rezeptor tragen.

Im **Pankreas** konnte der VPAC-2-Rezeptor in der vorliegenden Arbeit in den Langerhans-Inseln des endokrinen Anteils nachgewiesen werden. Interessanterweise scheint es in der Rezeptor-Expression einen deutlichen Unterschied zwischen dem Pankreasgewebe der Maus und der Ratte zu geben. Autoren, die, wie in dieser Arbeit, Rattengewebe untersucht hatten, beschrieben den VPAC-2-Rezeptor gleichfalls in den Langerhans-Inseln, genauer, in den sich dort befindlichen  $\beta$ -Zellen. Dort wirken sie funktionell an der Insulin- und Glukagonausschüttung mit (Ahrén 2008, Jamen et al. 2002, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009, Winzell und Ahrén 2007). Im Gegensatz dazu konnten Autorengruppen, die das Pankreasgewebe der Maus untersuchten, den VPAC-2-Rezeptor in pankreatischen Azinuszellen lokalisieren, so wie auch im Humangewebe der vorliegenden Arbeit beobachtet (Dickson und Finlayson 2009, Harmar et al. 2004, Moody et al. 2003).

Die Immunfärbung der vorhandenen **Nieren**-Schnitte ergab, gleichfalls wie im hier untersuchten Humangewebe, eine VPAC-2-Positivität der proximalen Nierentubuli. Laut der entsprechenden Literatur zum Nierengewebe der Maus und der Ratte, ist der VPAC-2-Rezeptor in der Niere lokalisiert (Brubel et al. 2011, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Harmar und Kollegen beschreiben den Rezeptor in den Blutgefäßen der Niere (Harmar et al. 2004), wohingegen Juarranz und Mitarbeiter ihn in den Sammelrohren der Niere vermuten (Juarranz et al. 1999). Diese Diskrepanzen in der Rezeptor-Lokalisation könnten auf die Verwendung von unterschiedlichen (polyklonalen) Antikörperseren zurückzuführen sein.

In der nahe gelegenen **Nebenniere** ließ sich mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper lediglich die Rinde kräftig und spezifisch immunfärben. Am intensivsten war dabei die äußerste der drei Schichten, die Zona glomerulosa, gefärbt. Dahingegen scheint die humane Nebenniere den VPAC-2-Rezeptor nicht zu enthalten. In der Literatur ist an Maus- und Rattengeweben mehrheitlich beschrieben worden, dass sowohl das Mark als auch die Rinde der Nebenniere den VPAC-2-Rezeptor enthalten (Harmar et al. 2004, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Daneben gibt es aber auch Forschergruppen, die den VPAC-2 nur im Nebennierenmark der Maus (Dickson und Finlayson 2009) oder nur in der Nebennierenrinde der Ratte (Juarranz et al. 1999) beschrieben. Klarheit darüber können weitere Immunfärbungen mit spezifischen monoklonalen Antikörpern bringen.

Eine deutliche Immunfärbung ließ sich desweiteren auf den B-Lymphozyten in den Malpighi-Körperchen der **Milz** beobachten, die im hier gefärbten Humangewebe jedoch deutlich schwächer ausgeprägt war. Mehrere Autoren konnten den VPAC-2-Rezeptor auf CD4-T-Zellen der Milz nachweisen (Valdehita et al. 2010, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009, Voice et al. 2004). Auch sind, wie bereits erläutert, Lymphozyten ein typischer Expressionsort des VPAC-2-Rezeptors.

Ebenso ließen sich bei den **Thymus**-Präparaten mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper starke und spezifische Immunfärbungen beobachten. Hierbei waren reife T-Lymphozyten in der Rindenregion VPAC-2-positiv. In der Literatur wird ein Vorhandensein des VPAC-2-Rezeptors im Thymusgewebe zwar beschrieben, ohne jedoch eine genaue Lokalisation anzugeben (Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009).

Eine sehr schwache und eher unspezifische Färbung ließ sich, wie im Humangewebe, bei den Schnitten des **Gehirns** darstellen. Hier war kaum eine Membranständigkeit zu erkennen und die Färbung orientierte sich an keinen festen Strukturen. Aufgrund der hohen funktionellen Relevanz dieses Organs, gibt es allerdings zahlreiche Untersuchungen an den Gehirnen von Mäusen und Ratten zur VPAC-2-Rezeptor-Expression, die verdeutlichen, dass VPAC-2-

positive Strukturen im Gehirn existieren. Eine der funktionell wichtigsten Regionen, die eine hohe VPAC-2-Expressionsdichte aufweist, ist der Nucleus suprachiasmaticus (SCN), ein Kerngebiet des Hypothalamus. Dort ist der Rezeptor in die korrekte Zellkommunikation des zirkadianen Schrittmachers involviert und hat so eine Funktion im Metabolismus, bei neuroendokrinen Funktionen und bei der Lokomotorik der Maus und der Ratte (Aton et al. 2005, Bechtold et al. 2008, Hannibal et al. 2011, Harmar et al. 2002, Harmar et al. 2012, Hughes et al. 2008, Hughes et al. 2011, Kalamatianos et al. 2004, Maywood et al. 2006, Meyer-Spasche und Piggins 2004, Pakhotin et al. 2006). Andere Forschergruppen entdeckten den Rezeptor zudem in allen weiteren Kernen des Hypothalamus (Ghourab et al. 2011, Moody et al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Weiterhin konnte der VPAC-2 in der inneren und der äußeren Granulosa-Zellschicht des Kleinhirnkortex der Ratte detektiert werden, jedoch lediglich in solch geringen Konzentrationen, dass er nicht funktionell war (Botia et al. 2007). Ein weiterer relevanter Expressionsort ist der Thalamus, der eine hohe Rezeptordichte aufweist (Lee und Cox 2006, Moody et al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Desweiteren exprimieren auch Astrozyten und Neuronen den VPAC-2-Rezeptor in relevanten Konzentrationen (Dickson und Finlayson 2009, Masmoudi-Kouki et al. 2007). Zusätzlich dazu sind neben dem Gehirn im Allgemeinen, auch der Bulbus olfactorius, der zerebrale Kortex, die Amygdala, der Hippocampus, die Epiphyse und verschiedene Hirnstammkerne laut Literatur VPAC-2-positiv (Dickson und Finlayson 2009, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Die Ursache für diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen in der Literatur und den hier erhobenen Befunden ist möglicherweise, dass die anderen Autoren polyklonale Antikörper verwendet hatten und somit auch teilweise unspezifische Immunsignale beschreiben.

Eine ebenfalls schwache Färbung ließ sich bei den Präparaten der **Hypophyse** beobachten, obwohl mehrere Autoren den VPAC-2-Rezeptor in der Hypophyse bzw. in der Adenohypophyse der Maus und der Ratte detektieren konnten. Dort waren insbesondere die Prolaktin-produzierenden Zellen VPAC-2-positiv (Dickson und Finlayson 2009, Moody et al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Auch die humanen Hypophysen-Präparate der vorliegenden Arbeit waren nur unspezifisch gefärbt.

Ähnlich war die Immunfärbung im **Rückenmark** bei Mensch und Ratte. Sie war nur sehr schwach ausgeprägt und kaum membranständig. Die Forschergruppe um Vaudry beschreibt in ihrer Arbeit allerdings die Motoneuronen als VPAC-2-positiv (Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Diese Befunde wurden allerdings mit polyklonalen Antikörpern erhoben.

Eher unspezifisch und nur sehr schwach waren die Präparate der **Tränendrüse** und der **Lymphknoten** gefärbt, wohingegen die B-Lymphozyten der humanen Lymphknoten den VPAC-2-Rezeptor deutlich enthielten. Zu diesen Geweben existieren keine Befunde in der Literatur.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der **Lungen**-Schnitte mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper ergaben nur unspezifische und schwache Resultate. Im Gegensatz dazu konnten zahlreiche Autoren den VPAC-2-Rezeptor in der Lunge der Ratte bzw. in den Lungenalveolen der Maus detektieren (Busto et al. 1999, Busto et al. 2000, Dickson und Finlayson 2009, Harmar et al. 2004, Juarranz et al. 1999, Tannu et al. 2010, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Weitere Untersuchungen zu diesem Gewebe sollten mit spezifischen monoklonalen Antikörpern folgen.

Die mit dem Anti-VPAC-2-Antikörper untersuchten **Uterus**- und **Hoden**-Präparate waren sehr schwach und größtenteils ebenfalls nicht membranständig gefärbt. Die humanen Uterus-Schnitte erwiesen sich als komplett VPAC-2-negativ. So wie auch in den vorher erwähnten, nur schwach gefärbten Gewebeschnitten der Ratte, waren hier lediglich lymphozytäre Ansammlungen, Blutgefäße oder die glatte Muskulatur positiv. In der Literatur erwähnen nur einige wenige Autoren eine Expression des VPAC-2-Rezeptors im Uterus, wobei er offensichtlich in den glatten Muskelzellen des Uterus exprimiert wird (Hauk et al. 2014, Juarranz et al. 1999). Deutlich zahlreicher sind die Untersuchungen zum Ovar der Maus und der Ratte. Dort sind laut Literatur einige Follikel, Granulosa-, Cumulus- und Theca-Zellen VPAC-2-positiv (Gabbay-Benziv et al. 2012, Juarranz et al. 1999, Ko und Park-Sarge 2000, Vaccari et al. 2006, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Auch wird berichtet, dass Strukturen des Hodens der Maus und der Ratte, darunter die Keimzellen, die Tubuli seminiferi, die Spermatiden und die Tunica albuginea den VPAC-2-Rezeptor exprimieren (Harmar et al. 2004, Moody et al. 2003, Vaudry et al. 2000, Vaudry et al. 2009). Außerdem enthalten das Corpus cavernosum des männlichen Reproduktionstraktes (Guidone et al. 2002, Vaudry et al. 2009, Zhang et al. 2010) sowie die Gänge des Nebenhodens und die Prostata-Membran den VPAC-2-Rezeptor. In der Ratten-Prostata scheint allerdings nur der dort weitaus häufiger auftretende VPAC-1 funktionell von Bedeutung zu sein (Juarranz et al. 1999). Weiterhin entdeckten Harmar und Kollegen den VPAC-2 in der glatten Muskulatur des gesamten Reproduktionstraktes und der Blutgefäße der Maus (Harmar et al. 2004). Auch andere Autoren konnten den Rezeptor im Blutgefäßsystem der Maus und der Ratte nachweisen (Baun et al. 2011, Dickson und Finlayson 2009).



Die untersuchten **Herz**-Präparate der vorliegenden Arbeit gehörten sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte zu den VPAC-2-negativen Geweben. In der Literatur berichtet auch nur eine einzelne Forschergruppe von einer Expression des VPAC-2-Rezeptors in den kardialen Myozyten von Rattenherzen (Baron et al. 2001).

Auch in den hier analysierten Schnitten der **Spinalganglien** ließ sich keine spezifische Immunfärbung beobachten. In der Literatur wurden Spinalganglien bisher nicht direkt untersucht, jedoch ließ sich der VPAC-2-Rezeptor im Ganglion sphenopalatinum der Ratte detektieren (Csati et al. 2012).

## 7 Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war eine detaillierte Charakterisierung der zwei neu entwickelten monoklonalen Kaninchen-Anti-Mensch-VPAC-1- (141H4L2) und -VPAC-2- (83H1L2) Antikörper. Der Spezifitätsnachweis wurde mittels immunzytochemischer Untersuchungen an stabil transfizierten HEK-293-Zellen, Western-Blot-Analysen, immunhistochemischen Färbungen an normalen Human- und Rattengeweben und an humanen Tumorgeweben sowie mit Hilfe von Peptidneutralisationen erbracht. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass der Anti-VPAC-1-Antikörper trotz vorhandener Unspezifitäten in den Western-Blot-Analysen und auch teilweise in der Immunhistochemie, sich für Untersuchungen an den VPAC-1-tragenden Zelllinien und für die Rezeptorsuche in Paraffinschnitten eignet. Der Anti-VPAC-2-Antikörper ist für Untersuchungen an Zellen und Zelllinien, Western-Blot-Analysen aus Zellen, Zelllinien und Geweben und immunhistochemischen Untersuchungen an in Paraffinschnitten eingebetteten Geweben, wie sie bei histopathologischen Routine-Untersuchungen standardmäßig angewendet werden, ohne Einschränkungen zu empfehlen.

Mit der Entwicklung der monoklonalen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörper ist es nun erstmals möglich geworden, die VPAC-1- bzw. VPAC-2-Rezeptoren, die in vielen normalen Humangeweben natürlich vorkommen und in zahlreichen humanen Tumorgeweben überexprimiert werden, zuverlässig und spezifisch darzustellen.

Insbesondere die immunhistochemischen Färbungen an humanen Tumorgeweben liefern Erkenntnisse, mit denen die Diagnostik und die Therapie von Tumorpatienten entscheidend mitbestimmt werden kann. So waren beide Rezeptoren hauptsächlich in Schilddrüsen-Karzinomen, in Tumoren des Magen-Darm-Traktes, in Angio- und Osteosarkomen sowie in Hämangiomen aufzufinden. Der VPAC-1 konnte separat jedoch auch oft in neuroendokrinen Tumoren, Rhabdomyosarkomen sowie in Pankreas-, Ovarial- und Cervix-Karzinomen detektiert werden, war aber in Hypophysenadenomen, Thymomen, Leiomyosarkomen sowie in Prostata-, Harnblasen- und Mamma-Karzinomen nicht ganz so häufig vertreten. Im Gegensatz dazu war regelmäßig eine Expression des VPAC-2 in Mamma-Karzinomen zu beobachten, jedoch seltener in Hypophysenadenomen, in Thymomen, in neuroendokrinen Tumoren, in Rhabdomyo- und pleomorphen Sarkomen sowie in Pankreas-, Harnblasen-, Ovarial- und Cervix-Karzinomen. Diese Kenntnis über Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede in der Expression dieser Rezeptoren im Gewebe kann in der alltäglichen klinischen Routine in der Tumorbehandlung oder für weitere Untersuchungen nützlich sein.

Mit den vorliegenden monoklonalen Anti-VPAC-1- (141H4L2) und Anti-VPAC-2- (83H1L2) Antikörpern ist es nun möglich, Antikörper in unbegrenzter Menge und in stets gleichbleibender Qualität und Spezifität bereitzustellen, wodurch vergleichbar gute und reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden können. Diese Möglichkeit war durch die bisher erhältlichen polyklonalen Antikörper nicht gegeben. Diese haben den entscheidenden Nachteil, stets neu produziert werden zu müssen und somit in ihrer Spezifität zu variieren. So kann ein monoklonaler Antikörper ein standardmäßiges Werkzeug in der Aufschlüsselung des Rezeptor-Expressionsmusters, z.B. auf verschiedenen Tumoren, sein.

Zusätzlich können die hier untersuchten monoklonalen humanen Anti-VPAC-1- und Anti-VPAC-2-Antikörper aufgrund der Sequenzähnlichkeit des antigenen carboxyterminalen Endes der Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte für die weitere Anwendung in der Forschung sehr dienlich sein.

## 8 Literaturverzeichnis

Ahrén B. 2008. Role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the pancreatic endocrine system. *Ann NY Acad Sci*, 1144:28-35.

Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED. 2005. Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nat Neurosci*, 8(4):476-483.

Bajo AM, Juarranz MG, Valenzuela P, Martínez P, Prieto JC, Guijarro LG. 2000. Expression of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human uterus. *Peptides*, 21:1383-1388.

Baron A, Monnier D, Roatti A, Baertschi AJ. 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide activates  $K_{ATP}$  current in rat atrial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 280:H1058-H1065.

Basille M, Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Fournier A, Fréger P, Gallo-Payet N, Vaudry H, Gonzalez B. 2006. Ontogeny of PACAP receptors in the human cerebellum: Perspectives of therapeutic applications. *Reg Pept*, 137:27-33.

Baun M, Hay-Schmidt A, Edvinsson L, Olesen J, Jansen-Olesen I. 2011. Pharmacological characterization and expression of VIP and PACAP receptors in isolated cranial arteries of the rat. *Eur J Pharmacol*, 670:186-194.

Bechtold DA, Brown TM, Luckman SM, Piggins HD. 2008. Metabolic rhythm abnormalities in mice lacking VIP-VPAC<sub>2</sub> signaling. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294:R344-R351.

Bhargava S, Licha K, Knaute T, Ebert B, Becker A, Grötzinger C, Hassenius C, Wiedenmann B, Schneider-Mergener J, Volkmer-Engert R. 2002. A complete substitutional analysis of VIP for better tumor imaging properties. *J Mol Recognit*, 15:145-153.

Botia B, Basille M, Allais A, Raoult E, Falluel-Morel A, Galas L, Jolivel V, Wurtz O, Komuro H, Fournier A, Vaudry H, Burel D, Gonzalez BJ, Vaudry D. 2007. Neurotrophic effects of PACAP in the cerebellar cortex. *Peptides*, 28:1746-1752.

Brubel R, Horvath G, Reglodi D, Lubics A, Tamas A, Kiss P, Laszlo E, Nemeth J, Mark L, Szakaly P. 2011. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its type I receptor in the rat kidney. *Transplant Proc*, 43:1297-1299.

Burian B, Storka A, Marzluf BA, Yen YC, Lambers C, Robibaro B, Vonbank K, Mosgoeller W, Petkov V. 2010. Vasoactive intestinal peptide (VIP) receptor expression in monocyte-derived macrophages from COPD patients. *Peptides* 31:603-608.

Busto R, Carrero I, Guijarro LG, Solano RM, Zapatero J, Nogueras F, Prieto JC. 1999. Expression, pharmacological, and functional evidence for PACAP/VIP receptors in human lung. *Am J Physiol*, 277(1):42-48.

Busto R, Prieto JC, Bodega G, Zapatero J, Carrero I. 2000. Immunohistochemical localization and distribution of VIP/PACAP receptors in human lung. *Peptides*, 21:265-269.

Busto R, Prieto JC, Bodega G, Zapatero J, Fogué L, Carrero I. 2003. VIP and PACAP receptors coupled to adenylyl cyclase in human lung cancer: A study in biopsy specimens. *Peptides*, 24:429-436.

Castorina A, Tiralongo A, Giunta S, Carnazza ML, Rasi G, D'Agata V. 2008. PACAP and VIP prevent apoptosis in schwannoma cells. *Brain Res*, 1241:29-35.

Collado B, Gutiérrez-Cañas I, Rodríguez-Henche N, Prieto JC, Carmena MJ. 2004. Vasoactive intestinal peptide increases vascular endothelial growth factor expression and neuroendocrine differentiation in human prostate cancer LNCaP cells. *Reg Pept*, 119:69-75.

Conconi MT, Spinazzi R, Nussdorfer GG. 2006. Endogenous ligands of PACAP/VIP receptors in the autocrine-paracrine regulation of the adrenal gland. *Int Rev Cytol*, 249:1-51.

Couvineau A, Laburthe M. 2012a. The family B1 GPCR: structural aspects and interaction with accessory proteins. *Curr Drug Targets*, 13:103-115.

Couvineau A, Laburthe M. 2012b. VPAC receptors: structure, molecular pharmacology and interaction with accessory proteins. *Br J Pharmacol*, 166:42-50.

Csati A, Tajti J, Kuris A, Tuka B, Edvinsson L, Warfvinge K. 2012. Distribution of vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating peptide, nitric oxide synthase, and their receptors in human and rat sphenopalatine ganglion. *Neuroscience*, 202:158-168.

Davis-Taber R, Baker S, Lehto SG, Zhong C, Surowy CS, Faltynek CR, Scott VE, Honore P. 2008. Central pituitary adenylate cyclase 1 receptors modulate nociceptive behaviors in both inflammatory and neuropathic pain states. *J Pain*, 9(5):449-456.

Dejda A, Jozwiak-Bebenista M, Nowak JZ. 2006. PACAP, VIP, and PHI. Effects on AC-, PLC-, and PLD-driven signaling systems in the primary glial cell cultures. *Ann NY Acad Sci*, 1070:220-225.

Dickson L, Finlayson K. 2009. VPAC and PAC receptors: From ligands to function. *Pharmacol Ther*, 121:294-316.

Dorsam GP, Benton K, Failing J, Batra S. 2011. Vasoactive intestinal peptide signaling axis in human leukemia. *World J Biol Chem*, 2(6):146-160.

Dübel S, Rohrbach P, Schmiedl A. 2004. Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Rekombinante Antikörper. *Biol Unserer Zeit*, 34(6):372-279.

Fahrenkrug J, Emson PC. 1982. Vasoactive intestinal polypeptide: Functional aspects. *Br Med Bull*, 38(3):265-270.

Fernández-Martínez AB, Carmena MJ, Arenas MI, Bajo AM, Prieto JC, Sánchez-Chapado M. 2012. Overexpression of vasoactive intestinal peptide receptors and cyclooxygenase-2 in human prostate cancer. Analysis of potential prognostic relevance. *Histol Histopathol*, 27(8):1093-1101.

Gabbay-Benziv R, Ao A, Fisch B, Zhang L, Oron G, Kessler-Icekson G, Ben-Haroush A, Krissi H, Abir R. 2012. Vasoactive intestinal peptide and its receptors in human ovarian cortical follicles. *PLoS ONE*, 7(5):e37015.

García-Fernández MO, Solano RM, Carmena MJ, Busto R, Bodega G, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC, Sánchez-Chapado M. 2003. Expression of functional PACAP/VIP receptors in human prostate cancer and healthy tissue. *Peptides*, 24:893-902.

García-Fernández MO, Collado B, Bodega G, Cortés J, Ruíz-Villaespesa A, Carmena MJ, Prieto JC. 2005. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide/vasoactive intestinal peptide receptors in human normal mammary gland and breast cancer tissue. *Gynecol Endocrinol*, 20(6):327-333.

Gericke MT, Kosacka J, Koch D, Nowicki M, Schröder T, Ricken AM, Nieber K, Spänzel-Borowski K. 2009. Receptors for NPY and PACAP differ in expression and activity during adipogenesis in the murine 3T3-L1 fibroblast cell line. *Br J Pharmacol*, 157:620-632.

Gether U. 2000. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 21(1):90-113.

Ghourab S, Beale KE, Semjonous NM, Simpson KA, Martin NM, Ghatei MA, Bloom SR, Smith KL. 2011. Intracerebroventricular administration of vasoactive intestinal peptide inhibits food intake. *Reg Pept*, 172:8-15.

Goetzl EJ, Voice JK, Shen S, Dorsam G, Kong Y, West KM, Morrison CF, Harmar AJ. 2001. Enhanced delayed-type hypersensitivity and diminished immediate-type hypersensitivity in mice lacking the inducible VPAC<sub>2</sub> receptor for vasoactive intestinal peptide. *Proc Natl Acad Sci*, 98(24):13854-13859.

Goetzl EJ. 2006. Hypothesis: VPAC G protein-coupled receptors for vasoactive intestinal peptide constitute a dynamic system for signaling T cells from plasma membrane and nuclear membrane complexes. *Reg Pept*, 137:75-78.

Granoth R, Fridkin M, Gozes I. 2000. VIP and the potent analog, stearyl-Nle<sup>17</sup>-VIP, induce proliferation of keratinocytes. *FEBS Lett*, 475:78-83.

Groneberg DA, Rabe KF, Fischer A. 2006. Novel concepts of neuropeptide-based drug therapy: Vasoactive intestinal polypeptide and its receptors. *Eur J Pharmacol*, 533:182-194.

Guidone G, Müller D, Vogt K, Mukhopadhyay AK. 2002. Characterization of VIP and PACAP receptors in cultured rat penis corpus cavernosum smooth muscle cells and their interaction with guanylate cyclase-B receptors. *Regul Pept*, 108:63-72.

Gutiérrez-Cañas I, Juarranz MG, Collado B, Rodríguez-Henche N, Chiloeches A, Prieto JC, Carmena MJ. 2005. Vasoactive intestinal peptide induces neuroendocrine differentiation in the LNCaP prostate cancer cell line through PKA, ERK, and PI3K. *The Prostate*, 63:44-55.

Hannibal J, Hsiung HM, Fahrenkrug J. 2011. Temporal phasing of locomotor activity, heart rate rhythmicity, and core body temperature is disrupted in VIP receptor 2-deficient mice. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 300:519-530.

Harfi I, D'Hondt S, Corazza F, Sariban E. 2004. Regulation of human polymorphonuclear leukocytes functions by the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide after activation of MAPKs. *J Immunol*, 173:4154-4163.

Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, Sheward WJ, Morrison CF, Dorin JR, Piggins HD, Reubi JC, Kelly JS, Maywood ES, Hastings MH. 2002. The VPAC2 receptor is essential for circadian function in the mouse suprachiasmatic nuclei. *Cell*, 109:497-508.

Harmar AJ, Sheward WJ, Morrison CF, Waser B, Gugger M, Reubi JC. 2004. Distribution of the VPAC<sub>2</sub> receptor in peripheral tissues of the mouse. *Endocrinol*, 145(3):1203-1210.

Harmar AJ, Fahrenkrug J, Gozes I, Laburthe M, May V, Pisegna JR, Vaudry D, Vaudry H, Waschek JA, Said SI. 2012. Pharmacology and functions of receptors for vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: IUPHAR Review 1. *Br J Pharmacol*, 166:4-17.

Hauk V, Azzam S, Calo G, Gallino L, Papparini D, Franchi A, Ramhorst R, Pérez Leirós C. 2014. VIP induces an immunosuppressant microenvironment in the maternal–fetal interface of non-obese diabetic mice and improves early pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol*, 71:120-130.



Hernández M, Barahona MV, Recio P, Rivera L, Benedito S, Martínez AC, García-Sacristán A, Orensanz LM, Prieto D. 2004. Heterogeneity of neuronal and smooth muscle receptors involved in the VIP- and PACAP-induced relaxations of the pig intravesical ureter. *Br J Pharmacol*, 141:123-131.

Hernández M, Barahona MV, Recio P, Benedito S, Martínez AC, Rivera L, García-Sacristán A, Prieto D, Orensanz LM. 2006. Neuronal and smooth muscle receptors involved in the PACAP- and VIP-induced relaxations of the pig urinary bladder neck. *Br J Pharmacol*, 149:100-109.

Hill JM, Hauser JM, Sheppard LM, Abebe D, Spivak-Pohis I, Kushnir M, Deitch I, Gozes I. 2007. Blockage of VIP during mouse embryogenesis modifies adult behavior and results in permanent changes in brain chemistry. *J Mol Neurosci*, 31(3):183-200.

Hughes ATL, Guilding C, Lennox L, Samuels RE, McMahon DG, Piggins HD. 2008. Live imaging of altered period1 expression in the suprachiasmatic nuclei of *Vipr2<sup>-/-</sup>* mice. *J Neurochem*, 106(4):1646-1657.

Hughes ATL, Guilding C, Piggins HD. 2011. Neuropeptide signaling differentially affects phase maintenance and rhythm generation in SCN and extra-SCN circadian oscillators. *PLoS ONE*, 6(4):e18926.

Igarashi H, Ito T, Pradhan TK, Mantey SA, Hou W, Coy DH, Jensen RT. 2002. Elucidation of the vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC<sub>2</sub> receptors in human and rat and comparison to the pharmacophore for VPAC<sub>1</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(2):445-460.

Igarashi H, Ito T, Mantey SA, Pradhan TK, Hou W, Coy DH, Jensen RT. 2005. Development of simplified vasoactive intestinal peptide analogs with receptor selectivity and stability for human vasoactive intestinal peptide/pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors. *J Pharmacol Exp Ther*, 315(1):370-381.

Jamen F, Puech R, Bockaert J, Brabet P, Bertrand G. 2002. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors mediating insulin secretion in rodent pancreatic islets are coupled to adenylate cyclase but not to PLC. *Endocrinol*, 143(4):1253-1259.

Juarranz MG, Rampelbergh JV, Gourlet P, de Neef P, Cnudde J, Robberecht P, Waelbroeck M. 1999. Different vasoactive intestinal polypeptide receptor domains are involved in the selective recognition of two VPAC<sub>2</sub>-selective ligands. *Mol Pharmacol*, 56:1280-1287.

Kaisler RE. 2008. VPAC receptors as target for anti-cancer drug delivery [Diplomarbeit]. Wien: Universität.

Kalamatianos T, Kallo I, Piggins HD, Coen CW. 2004. Expression of VIP and/or PACAP receptor mRNA in peptide synthesizing cells within the suprachiasmatic nucleus of the rat and in its efferent target sites. *J Comp Neurol*, 475:19-35.

Källström B-L, Waldeck B. 2001. Bronchodilating properties of the VIP receptor agonist Ro 25-1553 compared to those of formoterol on the guinea-pig isolated trachea. *Eur J Pharmacol*, 430:335-340.

Karacay B, O'Dorisio MS, Kasow K, Hollenback C, Krahe R. 2001. Expression and fine mapping of murine vasoactive intestinal peptide receptor 1. *J Mol Neurosci*, 17(3):311-324.

Kato E, Yamane S, Nomura R, Matsumoto K, Tashima K, Horie S, Saito T, Fujino H, Toshihiko Murayama T. 2012. Dysfunction of neurogenic VIP-mediated relaxation in mouse distal colon with dextran sulfate sodium-induced colitis. *Pharmacol Res*, 65:204-212.

Kim WK, Kan Y, Ganea D, Hart RP, Gozes I, Jonakait GM. 2000. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit tumor necrosis factor- $\alpha$  production in injured spinal cord and in activated microglia via a cAMP-dependent pathway. *J Neurosci*, 20(10):3622-3630.

Ko C, Park-Sarge OK. 2000. Progesterone receptor activation mediates LH-induced type-I pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor (PAC<sub>1</sub>) gene expression in rat granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 277:270-279.

Köhler G, Milstein C. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.

Laburthe M, Couvineau A. 2002. Molecular pharmacology and structure of VPAC receptors for VIP and PACAP. *Reg Pept*, 108:165-173.

Langer I. 2012. Mechanisms involved in VPAC receptors activation and regulation: lessons from pharmacological and mutagenesis studies. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 3:129.

Lee SH, Cox CL. 2006. Excitatory actions of vasoactive intestinal peptide on mouse thalamocortical neurons are mediated by VPAC<sub>2</sub> receptors. *J Neurophysiol*, 96:858-871.

Lindén A, Hansson L, Andersson A, Palmqvist M, Arvidsson P, Löfdahl C-G, Larsson P, Lötvall J. 2003. Bronchodilation by an inhaled VPAC<sub>2</sub> receptor agonist in patients with stable asthma. *Thorax*, 58:217-221.

Mahavadi S, Bhattacharya S, Kim J, Fayed S, Al-Shboul O, Grider JR, Murthy KS. 2013. Caveolae-dependent internalization and homologous desensitization of VIP/PACAP receptor, VPAC<sub>2</sub>, in gastrointestinal smooth muscle. *Peptides*, 43:137-145.

Masmoudi-Kouki O, Gandolfo P, Castel H, Leprince J, Fournier A, Dejda A, Vaudry H, Tonon M-C. 2007. Role of PACAP and VIP in astroglial functions. *Peptides*, 28:1753-1760.

Maywood ES, Reddy AB, Wong GKY, O'Neill JS, O'Brien JA, McMahon DG, Harmar AJ, Okamura H, Hastings MH. 2006. Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Curr Biol*, 16:599-605.

Mazzocchi G, Malendowicz LK, Rebuffat P, Gottardo L, Nussdorfer GG. 2002. Expression and function of vasoactive intestinal peptide, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, and their receptors in the human adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 87(6):2575-2580.

Meyer-Spasche A, Piggins HD. 2004. Vasoactive intestinal polypeptide phase-advances the rat suprachiasmatic nuclei circadian pacemaker in vitro via protein kinase A and mitogen-activated protein kinase. *Neurosci Lett*, 358:91-94.

Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minaminot N, Ueharasa A, Jiang L, Cullern MD, Coy DH. 1989. Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 164(1):567-574.

Moody TW, Jensen RT, Fridkin M, Gozes I. 2002. (N-stearyl, Norleucine<sup>17</sup>)VIPhybrid is a broad spectrum vasoactive intestinal peptide receptor antagonist. *J Mol Neurosci*, 18(1-2):29-35.

Moody TW, Hill JM, Jensen RT. 2003. VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides*, 24:163-177.

Moody TW, Gozes I. 2007. Vasoactive intestinal peptide receptors: a molecular target in breast and lung cancer. *Curr Pharm Des*, 13(11):1099-1104.

Morelli MB, Barberi M, Gambardella A, Borini A, Cecconi S, Coticchio G, Canipari R. 2008. Characterization, expression, and functional activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors in human granulosa-luteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 93(12):4924-4932.

Murphy K, Travers P, Walport M. 2009. *Janeway Immunologie*. Siebte Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Ogi K, Miyamoto Y, Masuda Y, Habata Y, Hosoya M, Ohtaki T, Masuo Y, Onda H, Fujino M. 1993. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a human pituitary adenylate cyclase activating polypeptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 196:1511-1521.

Ortner A, Wernig K, Kaisler R, Edetsberger M, Hajos F, Köhler G, Mosgoeller W, Zimmer A. 2010. VPAC receptor mediated tumor cell targeting by protamine based nanoparticles. *J Drug Target*, 18(6):457-67.

Pakhotin P, Harmar AJ, Verkhatsky A, Piggins HD. 2006. VIP receptors control excitability of suprachiasmatic nuclei neurones. *Eur J Physiol*, 452:7-15.

Persson E, Lerner UH. 2011. The neuropeptide VIP regulates the expression of osteoclastogenic factors in osteoblasts. *J Cell Biochem*, 112:3732-3741.

Pozo D. 2003. VIP- and PACAP-mediated immunomodulation as prospective therapeutic tools. *Trends Mol Med*, 9(5):211-217.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2008. *Biochemie*. Zweite Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.

Remmele W, Stegner HE. 1987. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe*, 8:138-140.

Reubi JC, Gugger M, Waser B. 2002. Co-expressed peptide receptors in breast cancer as a molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med*, 29:855-862.

Reubi JC, Waser B. 2003. Concomitant expression of several peptide receptors in neuroendocrine tumours: molecular basis for in vivo multireceptor tumour targeting. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 30(5):781-793.

Reubi JC, Körner M, Waser B, Mazzucchelli L, Guillou L. 2004. High expression of peptide receptors as a novel target in gastrointestinal stromal tumours. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 31:803-810.

Saetrum Opgaard O, Knutsson M, de Vries R, Tom B, Saxena PR, Edvinsson L. 2001. Vasoactive intestinal peptide has a direct positive inotropic effect on isolated human myocardial trabeculae. *Clin Sci*, 101:637-643.

Said SI, Mutt V. 1970. Polypeptide with broad biological activity: isolation from small intestine. *Science*, 169(3951):1217-1218.

Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V, Schulz S. 2004. Immunocytochemical identification of VPAC<sub>1</sub>, VPAC<sub>2</sub>, and PAC<sub>1</sub> receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res*, 10(24):8235-8242.

Schulz S, Mann A, Novakhov B, Piggins HD, Lupp A. 2014. VPAC<sub>2</sub> receptor expression in human normal and neoplastic tissues: evaluation of the novel monoclonal antibody SP235. *Endocr Connect*, Revision eingereicht.

Scriba PC, Pforte A. 2000. Taschenbuch der medizinisch-klinischen Diagnostik. Dreiundsiebzigste Aufl. Berlin, Heidelberg, New York, Barcelona, Hongkong, London, Mailand, Paris, Singapur, Tokio: Springer.

Shetzline MA, Walker JKL, Valenzano KJ, Premont RT. 2002. Mechanisms of signal transduction: vasoactive intestinal polypeptide type-1 receptor regulation: desensitization, phosphorylation, and sequestration. *J Biol Chem*, 277(28):25519-25526.

Shi XZ, Sarna SK. 2008. Gene therapy of Ca<sub>v</sub>1.2 channel with VIP and VIP receptor agonists and antagonists: a novel approach to designing promotility and antimotility agents. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 295:G187-G196.

Shreeve SM, Sreedharan SP, Hacker MP, Gannon DE, Morgan MJ. 2000. VIP activates G<sub>s</sub> and G<sub>i3</sub> in rat alveolar macrophages and G<sub>s</sub> in HEK293 cells transfected with the human VPAC<sub>1</sub> receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 272:922-928.

Sreedharan SP, Patel DR, Huang JX, Goetzl EJ. 1993. Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 193:546-553.

Storka A, Burian B, Führlinger G, Clive B, Sun T, Crevenna R, Gsur A, Mosgöller W, Wolzt M. 2013. VPAC<sub>1</sub> receptor expression in peripheral blood mononuclear cells in a human endotoxemia model. *J Transl Med*, 11:117.

Svoboda M, Tastenoy M, van Rampelbergh J, Goossens JF, de Neef P, Waelbroeck M, Robberecht P. 1994. Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 205:1617-1624.

Tannu SA, Renzetti LM, Tare N, Ventre JD, Lavelle D, Lin TA, Morschauser A, Paciorek J, Bolin DR, Michel H, Singer L, Hargaden M, Knowles JD, Gardiner P, Cazzola M, Calzetta L, Matera MG, Hicks A. 2010. Dual bronchodilatory and pulmonary anti-inflammatory activity of RO5024118, a novel agonist at vasoactive intestinal peptide VPAC<sub>2</sub> receptors. *Br J Pharmacol*, 161:1329-1342.

Vacas E, Bajo AM, Schally AV, Sánchez-Chapado M, Prieto JC, Carmena MJ. 2013. Vasoactive intestinal peptide induces oxidative stress and suppresses metastatic potential in human clear cell renal cell carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*, 365:212-222.

Vaccari S, Latini S, Barberi M, Teti A, Stefanini M, Canipari R. 2006. Characterization and expression of different pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide/vasoactive intestinal polypeptide receptors in rat ovarian follicles. *J Endocrinol*, 191:287-299.

Valdehita A, Carmena MJ, Collado B, Prieto JC, Bajo AM. 2007. Vasoactive intestinal peptide (VIP) increases vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and secretion in human breast cancer cells. *Reg Pept*, 144:101-108.

Valdehita A, Bajo AM, Schally AV, Varga JL, Carmena MJ, Prieto JC. 2009. Vasoactive intestinal peptide (VIP) induces transactivation of EGFR and HER2 in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 302:41-48.

Valdehita A, Bajo AM, Fernández-Martínez AB, Arenas MI, Vacas E, Valenzuela P, Ruíz-Villaespesa A, Prieto JC, Carmena MJ. 2010. Nuclear localization of vasoactive intestinal peptide (VIP) receptors in human breast cancer. *Peptides*, 31:2035-2045.

Valdehita A, Carmena MJ, Bajo AM, Prieto JC. 2012. RNA interference-directed silencing of VPAC1 receptor inhibits VIP effects on both EGFR and HER2 transactivation and VEGF secretion in human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*, 348:241-246.

Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, Vaudry H. 2000. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev*, 52(2):269-324.

Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BKC, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H. 2009. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev*, 61(3):283-357.

Voice J, Donnelly S, Dorsam G, Dolganov G, Paul S, Goetzl EJ. 2004. c-Maf and JunB mediation of Th2 differentiation induced by the type 2 G protein-coupled receptor (VPAC<sub>2</sub>) for vasoactive intestinal peptide. *J Immunol*, 172:7289-7296.

Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T. 2013. *Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe. Zweite Aufl.* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

Vomhof-DeKrey EE, Dorsam GP. 2008. Stimulatory and suppressive signal transduction regulates vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VPAC-1) in primary mouse CD4 T cells. *Brain Behav Immun*, 22(7):1024-1031.

Vosko AM, Schroeder A, Loh DH, Colwell CS. 2007. Vasoactive intestinal peptide and the mammalian circadian system. *Gen Comp Endocrinol*, 152:165-175.

Wei M, Fujiki K, Ando E, Zhang S, Ozaki T, Ishiguro H, Kondo T, Nokihara K, Wray V, Naruse S. 2007. Identification of key residues that cause differential gallbladder response to PACAP and VIP in the guinea pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292: G76-G83.

White CM, Ji S, Cai H, Maudsley S, Martin B. 2010. Therapeutic potential of vasoactive intestinal peptide and its receptors in neurological disorders. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9(5):661-666.

Winzell MS, Ahrén B. 2007. Role of VIP and PACAP in islet function. *Peptides*, 28:1805-1813.



Yadav M, Goetzl EJ. 2008. Vasoactive intestinal peptide-mediated Th17 differentiation: an expanding spectrum of vasoactive intestinal peptide effects in immunity and autoimmunity. *Ann NY Acad Sci*, 1144:83-89.

Yang J, Shi Q-D, Song T-B, Feng G-F, Zang W-J, Zong C-H, Chang L. 2013. Vasoactive intestinal peptide increases VEGF expression to promote proliferation of brain vascular endothelial cells via the cAMP/PKA pathway after ischemic insult in vitro. *Peptides*, 42:105-111.

Yang K, Trepanier CH, Li H, Beazely MA, Lerner EA, Jackson MF, MacDonald JF. 2009. Vasoactive intestinal peptide (VIP) acts via multiple signal pathways to regulate hippocampal NMDA receptors and synaptic transmission. *Hippocampus*, 19(9):779-789.

Zhang K, Aruva MR, Shanthly N, Cardi CA, Patel CA, Rattan S, Cefarone G, Wickstrom E, Thakur ML. 2007. Vasoactive intestinal peptide (VIP) and pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) receptor specific peptide analogues for PET imaging of breast cancer: In vitro/in vivo evaluation. *Reg Pept*, 144(1-3):91-100.

Zhang MG, Shen ZJ, Zhang CM, Wu W, Gao PJ, Chen SW, Zhou WL. 2010. Vasoactive intestinal polypeptide, an erectile neurotransmitter, improves erectile function more significantly in castrated rats than in normal rats. *BJU Int*, 108:440-446.

Zhou R, Tsang AHK, Lau SW, Ge W. 2011. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) and its receptors in the zebrafish ovary: evidence for potentially dual roles of PACAP in controlling final oocyte maturation. *Biol Reprod*, 85:615-625.

Zia H, Leyton J, Casibang M, Haul V, Brenneman D, Fridkin M, Gozes I, Moody TW. 2000. (N-stearyl, Norleucine<sup>17</sup>) VIP hybrid inhibits the growth of pancreatic cancer cell lines. *Life Sci*, 65(5):379-387.

## **9 Anhang**

### **9.1 Lebenslauf und Publikation**

#### **Persönliche Daten**

Name: Benjamin Novakhov  
Geburtsdatum: 25.12.1990  
Geburtsort: Baku (Aserbaidshan)  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

#### **Schulausbildung**

1998 – 2002 Besuch der Grundschule Christoph-Wilhelm-Hufeland-Schule in Bad  
Langensalza  
2002 – 2010 Besuch des Salza-Gymnasiums in Bad Langensalza  
2010 Schulabschluss Abitur

#### **Studium**

2010 – 2016 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena  
09/2012 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
10/2015 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2016 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

#### **Publikation**

Schulz S, Mann A, Novakhov B, Piggins HD, Lupp A. 2014. VPAC<sub>2</sub> receptor expression in human normal and neoplastic tissues: evaluation of the novel monoclonal antibody SP235. Endocr Connect, 4(1):18-26.

## 9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,  
ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,  
mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau apl. Prof. Dr. med. habil. A. Lupp, Herr Prof. Dr. med. habil. S. Schulz,  
die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,  
dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und  
dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Benjamin Novakhov

### **9.3 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich an Frau Professor Dr. med. A. Lupp einen ganz besonderen Dank für die Vergabe des Dissertationsthemas aussprechen. Auch bedanke ich mich bei ihr für die stets hervorragende und wunderbare Unterstützung. Sie stand mir bei den Experimenten, bei der Auswertung und bei der späteren Niederschrift jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Auch einen herzlichen Dank an die Mitarbeiter des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie für die gute Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft sowie eine freundliche Arbeitsatmosphäre.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken, die immer ein offenes Ohr für mich hatten.